

Charakterisierung der N-terminalen Domäne des Oberflächenproteins ActA aus *Listeria monocytogenes*: Wechselwirkung mit Komponenten des Mikrofilamentsystems der Wirtszelle

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Barbara Maria Behrendt
aus Bad Oldesloe

1. Referent: Prof. Dr. J. Wehland

2. Referent: Prof. Dr. G. S. Chhatwal

eingereicht am: 02.10.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.12.2000

2000

Druckjahr

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. J. Wehland, in den folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Rottner K., Behrendt B., Small J.V. & Wehland J.; VASP dynamics during lamellipodia protrusion (1999); Nature Cell Biology Vol 1:321-322

Tagungsbeiträge:

B.Behrendt, M.Konradt, A.Sechi, K.Niebuhr-Ebel & J.Wehtland

Functional analysis of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* by microinjection of antibodies (Poster) 13th meeting of the European Cytoskeleton Forum in Strasbourg, Frankreich (1998)

B.Behrendt, K.Rottner, V.Small & J.Wehtland

Analysis of involvement of the Ena/VASP proteins in the dynamics in lamellipodia using GFP-tagged VASP (Poster) 14th meeting of the European Cytoskeleton Forum, Oreias, Portugal (1999)

B.Behrendt, K.Niebuhr-Ebel and J.Wehtland

Identification and characterisation of a 34 kDa protein: a potential analogue of ActA protein of *Listeria monocytogenes* (Poster) 15th meeting of the European Cytoskeleton Forum, Blankenberg, Belgien (2000)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen.....	V
1. Einleitung.....	7
1.1 Aktinpolymerisation.....	8
1.2 Listerien.....	9
1.2.1 Der Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2.2 ActA.....	12
1.3 Wirtszelliganden von ActA.....	14
1.3.1 Der Arp2/3-Komplex.....	14
1.3.2 Die Ena/VASP-Proteinfamilie	15
1.4 Die Dynamik von Zytoskelettproteinen.....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Materialien	19
2.2 Mikrobiologische Kulturen.....	19
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	19
2.2.2 Listerien.....	20
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.3.1 Klonierung von DNA Konstrukten.....	22
2.3.2 Transformation von Ligationsansätzen und Plasmiden in <i>E.coli</i>	23
2.3.3 Arbeiten mit DNA	24
2.3.4 Screening einer cDNA-Expressions-Bibliothek	26
2.3.5 Arbeiten mit RNA	27
2.3.6 spezielle molekularbiologische Methoden	28
2.4. Gewebekultur	31
2.4.1 Allgemeine Gewebekulturarbeiten.....	32
2.4.2 Zellbiologische Techniken.....	33
2.4.3 Generierung von Antikörpern.....	35
2.4.4 Immunchemische Nachweismethoden	38

2.4.5	Immunologische Methoden	41
2.4.6	Biochemische Methoden.....	45
2.4.7	Indirekte Immunfluoreszenz und Digitale Videomikroskopie	49
2.4.8	Digitale Fluoreszenzmikroskopie	51
3.	Ergebnisse	54
3.1	Funktionsuntersuchungen des N-terminalen Bereiches von ActA und Identifizierung von eukaryonten ActA analogen Proteinen unter Verwendung von ActA spezifischen Antikörpern.....	54
3.1.1	Herstellung spezifischer polyklonaler Peptidantikörper gegen die Aminosäuren 79-109 von ActA	56
3.1.2	Herstellung spezifischer monoklonaler Peptidantikörper gegen den Aminosäurebereich 141-171 von ActA	57
3.1.3	Mikroinjektion von ActA-spezifischen Antikörpern in Epithelzellen vor der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	59
3.1.4	Mikroinjektion ActA-spezifischer Antikörper in Epithelzellen während der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	64
3.1.5	Kreuzreaktion von ActA-spezifischen Antikörpern im Western Blot und in der Immunfluoreszenz mit Wirtszellproteinen	67
3.1.6	Suche nach den eukaryonten Analoga des listeriellen Proteins ActA	68
3.1.7	Identifizierung des Proteins prp48 als analoges, eukaryontes Protein von ActA.....	70
3.1.8	Klonierung der c-DNA des humanen prp48 Proteins aus HeLa-RNA durch „rapid amplification of c-DNA ends“ (RACE).....	70
3.1.9	Isolierung der c-DNA prp48-1 von RNA aus HeLa-Zellen durch RT-PCR	72
3.1.10	GFP-hu prp48-1 lokalisiert in REF52-Zellen in „focal contacts“	72
3.1.11	Die prp48-Familie	73
3.1.12	Charakterisierung des prp 48-Proteins	74
3.2	Herstellung von GFP-Antikörpern.....	76
3.2.1	Herstellung von monoklonalen GFP-Antikörpern.....	77
3.2.2	Polyklonale GFP-Antikörper	80
3.3	Untersuchung der Dynamik von Bindungspartnern des listeriellen Oberflächenproteins ActA	82
3.3.1	Lokalisation von GFP-Ena/VASP-Familienmitgliedern in PtK2 und	

B16F1 Zellen.....	82
3.3.2 Lokalisation von GFP-Arp3 und GFP-p21-Arc Proteinen in B16F1 Zellen.....	87
3.3.3 Darstellung von GFP-Fusionsproteinen in mit <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten Zellen.....	90
3.3.4 Arp2/3-Komplex Rekrutierung durch intrazelluläre Listerien in Gegenwart der Aktin depolymerisierenden Substanz Latrunkulin B.....	93
4. Diskussion.....	96
4.1 Funktionelle Untersuchungen des N-Terminus des ActA Proteins	97
4.2 Identifizierung des prp48 Proteins als neues ActA Analoga.....	101
4.3 Untersuchung zur Lokalisation und Dynamik von GFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen.....	106
4.3.1 Lokalisation und Dynamik von EVH1- Domänen tragenden Proteinen in Lamellipodien und dem listeriellen Modellsystem.....	107
4.3.2 Die Lokalisation der Ena/VASP-Familie in Lamellipodien.....	108
4.3.3 Lokalisation und Dynamik des Arp2/3-Komplexes und Aktin	110
4.4 Verwendung von GFP-Antikörpern.....	111
4.5 Alternativen des listeriellen Modellsystems	113
4.6 Ausblick	115
5. Zusammenfassung	117
6. Literaturverzeichnis	119
7. Anhang.....	130
8. Danksagung	133

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ActA (<i>actA</i>)	Aktin-Nukleationsfaktor (<i>Gen</i>)
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
Arc	actin related complex
Arp	actin related protein
bp	Basenpaare
BHI	„Brain and Heart Infusion“
°C	Grad Celsius
CB	Cytoskeleton-Buffer
CFA	komplettes Freud'sches Adjuvans
Cy 3	Carbocyanin 3
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	DesoxyribonukleaseI
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced-Chemo-Luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EVI	Ena/VASP homology
EVL	Ena- VASP-like
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glutaraldehyd
G-Aktin	globuläres Aktin
GFP(<i>gfp</i>)	green fluorescent protein (<i>Gen</i>)
h	Stunde
HC	heavy chain
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hly	Listeriolysin
hu	human
IFA	inkomplettes Freud'sches Adjuvans
IG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
konz.	konzentriert
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria-Bertanibroth

LC	light chain
m	murin
M	molar
mA	milli Ampere
mAk	monoklonale Antikörper
MEM	Minimal Essential Medium
MENA	mammalian enabled
min	Minute/n
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n.d.	not done
n.n.	nicht nachweisbar
OD	Optische Dichte
o.n.	over night
p.a.	pro analysii
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pAk	polyklonale Antikörper
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PrfA	positiver Regulationsfaktor
prp48	proline-rich protein 48
PVDF	Poly-Vinylidene-Di-Fluorid
RACE	rapid amplification of c-DNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s	Sekunden
SCAR	Suppressor des cAMP Rezeptors
SDS	Sodium-Dodecyl Sulfate
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
v/v	Volumen pro Volumen
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.A.	zur Analyse

1. Einleitung

Alle autonomen Lebensformen sind auf Einzelzellen zurückzuführen. Im Gegensatz zu Einzellern bestehen komplexere eukaryonte Lebewesen aus einer Vielzahl zusammenwirkender, unterschiedlich differenzierter Zellen. Im Gegensatz zu prokaryontischen haben alle eukaryonten Zellen einen hohen inneren Organisationsgrad. Die meisten eukaryonten Zellen können sich bewegen, zum Beispiel während der Embryogenese, bei Immunantworten oder bei metastasierenden Zellen ist die Motilität von Einzelzellen von entscheidender Bedeutung. Für diese Bewegung ist wichtig, daß die Zelle ihre Form verändert. Diese motilen Eigenschaften beruhen auf dem Zytoskelett, einer komplexen Organisation von zytoplasmatischen Proteinfilamenten (Alberts 1986).

Die Zytoskelettproteine sind für die Zelle essentiell, da sie für die zellulären und subzellulären Bewegungsvorgänge, die Zellteilung, sowie für die Gestalt der Zelle verantwortlich sind. Aktinfilament-, Mikrotubuli- und Intermediärzytoskelettelemente sind die Zellbestandteile, die mit assoziierten Proteinen und Signalproteinen die dynamische Zellbewegung organisieren und koordinieren. Das Intermediärfilamentsystem gibt der Zelle Gestalt und mechanische Festigkeit. Die Mikrotubuli sind für die intrazellulären Transportvorgänge von Vesikeln und die Chromosomenverteilung bei der Mitose notwendig. Das Mikrofilamentsystem der Aktinfilamente dient als dynamisches System der Änderung der Gestalt, der Zellteilung und der Fortbewegung motiler Zellen. Das Aktinfilamentsystem unterliegt je nach Zelltyp einer starken Dynamik, wobei die Grundlage der Funktionsweise dieser Dynamik die ständige Polymerisation und Depolymerisation von globulären Aktinmonomeren (G-Aktin) ist. Bei der Polymerisation werden die Monomere zu einem längeren, filamentösen Aktinpolymer (F-Aktin) vernetzt. Im Gegensatz dazu führt der reverse Prozeß, die Depolymerisation, wieder zu freien Aktinmonomeren (Darnell 1994). An diesem komplexen Prozeß der Nukleation und Polymerisation der Aktinmonomere bis zur Vernetzung der Aktinfilamente sind viele Proteine beteiligt, welche teilweise als organisatorische Einheiten wirken, wie z.B. der „actin related protein“ (Arp) 2/3-Komplex (Machesky and Gould 1999, Chen et al. 2000).

Zur Analyse der Organisation und Funktionsweise der aktinvermittelten Dynamik sind Modellsysteme wichtig, die durch Reduktion auf die notwendigen Komponenten zur Aufklärung der Aktinfilamentdynamik beitragen können (Theriot et al. 1994). Ein solches Modellsystem sind intrazelluläre Pathogene, die zu einer gerichteten, aktinvermittelten Bewegung fähig sind. Zu diesen Erregern gehören u.a. die fakultativ intrazellulär lebenden Bakterien, Listerien und Shigellen, sowie die obligat intrazellulär lebenden Bakterien Rickettsien und die Vaccinia Viren

(Bernardini et al.1989, Heinzen et al. 1993, Cudmore et al.1995). Sie können innerhalb der Zelle gerichtete Bewegungen ausführen, die auf der Rekrutierung von wirtszelleigenen Proteinen des Aktinfilamentzytoskeletts basieren. Von allgemeinem Interesse ist es daher diese Wirtszellproteine zu identifizieren und ihre Funktion in der aktinvermittelten Bewegung der Zelle zu analysieren.

1.1 Aktinpolymerisation

An der Polymerisation und Depolymerisation der 42 kDa großen, globulären Aktinmoleküle sind verschiedene aktinassoziierte und regulatorische Proteine beteiligt. Über *in vitro* Daten konnte ein Gleichgewicht zwischen Aktinpolymerisation und Aktindepolymerisation festgestellt werden, das als „steady state“ bezeichnet wird. Theoretisch bildet es die Grundlage der Aktindynamik innerhalb der Zelle. Während G-Aktin in der Zelle frei oder als Komplex mit Proteinen wie Thymosin β 4 oder Profilin vorliegt (Pantaloni et al. 1993, Sohn et al. 1994), ist F-Aktin innerhalb der Zelle hauptsächlich in Streßfasern, Lamellipodien, Filopodien und dem submembranösen Netzwerk lokalisiert. Während die relativ undynamischen Streßfasern, die Aufgabe haben, die Gestalt der Zelle zu erhalten, handelt es sich bei den Lamellipodien um Zellausläufer mit einer hohen Dynamik. Der äußerste Saum der Lamellipodien, die Führungslamelle, zeichnet sich durch ein dichtes Netzwerk von F-Aktin aus. Es existieren verschiedene Modellvorstellungen wie eine Zelle das Aktinfilamentsystem koordiniert. Dabei finden sich Parallelen zwischen der aktinvermittelten Bewegung der Lamellipodien und der Fortbewegung des pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (siehe Abbildung 1). Die Polymerisation von filamentösem Aktin beginnt mit der Nukleation von globulärem Aktin, das zur Verlängerung (Elongation) der Aktinfilamente führt. Dadurch entsteht die Kraft, die für die Vorwärtsbewegung von Lamellipodien und intrazellulären Listerien verantwortlich ist.

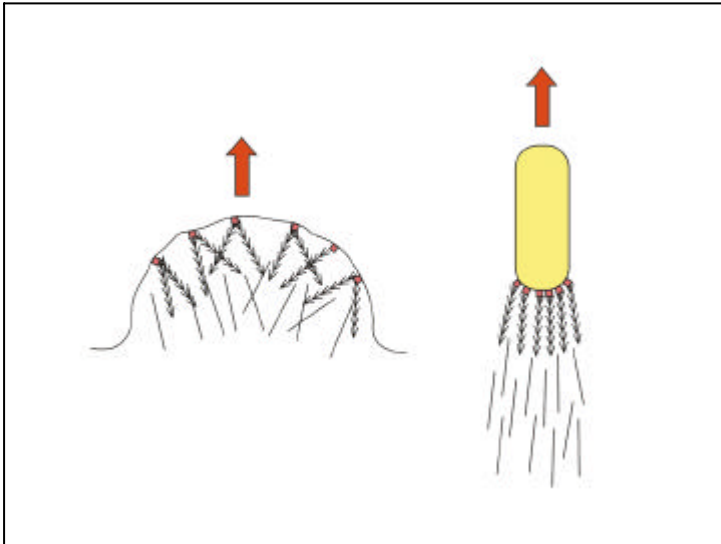


Abbildung 1: Vergleichende Darstellung der Aktinverteilung in expandierenden Lamellipodien (links) und Aktinschweiften (rechts) von intrazellulären Listerien. Direkt an der Führungslamelle und direkt an dem posterioren Pol der Listerien findet die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin statt.

Letztendlich bedeutet dies, daß die Polymerisation und Elongation grundsätzlich an dem (+)-Ende –„barbed end“ genannt– durchgeführt wird. Das entgegengesetzte (-)-Ende –„pointed end“– besitzt hingegen an den Abbauorten des F-Aktins eine niedrige G-Aktin Affinität, was einschließt, daß hier die Depolymerisation stattfindet. Diese Dynamik unterliegt zumindest *in vitro* einer strengen Kinetik. Für Listerien und Lamellipodien führt das dazu, daß die Polymerisation direkt hinter einem Pol des Bakteriums bzw. direkt im vorderen Saum der Führungslamelle d.h. unmittelbar an der Plasmamembran stattfindet.

1.2 Listerien

Listerien sind Gram-positive, nicht sporulierende, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Sie haben ein ubiquitäres Vorkommen in Boden, Wasser und Pflanzen. Außerdem können sie Säugetiere, Vögel und Fische besiedeln. Listerien stellen ein ernsthaftes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar, da sie sich auch unter extremen Bedingungen wie z.B. hoher Salzkonzentration, niedrigem pH-Wert und niedrigen Temperaturen vermehren können (Schlegel 1992).

Listeria monocytogenes und *Listeria ivanovii* gehören zu den sechs bekannten Listerienarten und zählen zu den opportunistischen Krankheitserregern. Während *Listeria ivanovii* tierpathogen ist, kann *Listeria monocytogenes* ebenfalls Menschen infizieren. Beide Erreger werden hauptsächlich über kontaminierte Nahrungs- bzw. Futtermittel aufgenommen (Faber et al. 1991). Da intrazelluläre Pathogene wie Listerien auf Grund ihres speziellen Infektionszyklus der humoralen Immunantwort ausweichen (siehe Abbildung 2), sind sie für unterschiedliche Krankheitsformen verantwortlich. Insbesondere immungeschwächte Individuen sind gefährdet.

Haben Listerien die erste Schutzbarriere des Wirtes umgangen, wie z.B. die Schleimhautoberflächen des Darms, und sind somit in den Körper gelangt, können sie durch systemische Ausbreitung bei Schwangeren die Plazentaschranke überwinden. Es kann zu Fehlgeburten oder konnatalen Infektionen kommen (Gellin et al. 1989). Das Krankheitsbild der in Deutschland meldepflichtigen Listeriose umfaßt zu Beginn unspezifische Symptome wie Kopf-, Nacken- und Rückenschmerzen, was bei akuten Infektionen zu einer Bakteriämie oder Herzinnehtzündung (Endokarditis) und auf Grund der Fähigkeit von Listerien, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, auch zu Meningitis und Enzephalitis führen kann (Wiesmann 1986).

1.2.1 Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Die Möglichkeit der intrazellulären Lebensweise von *Listeria monocytogenes* basiert auf der Expression spezifischer Virulenzfaktoren. Diese Faktoren ermöglichen es, unterschiedlichste Zellen zu infizieren.

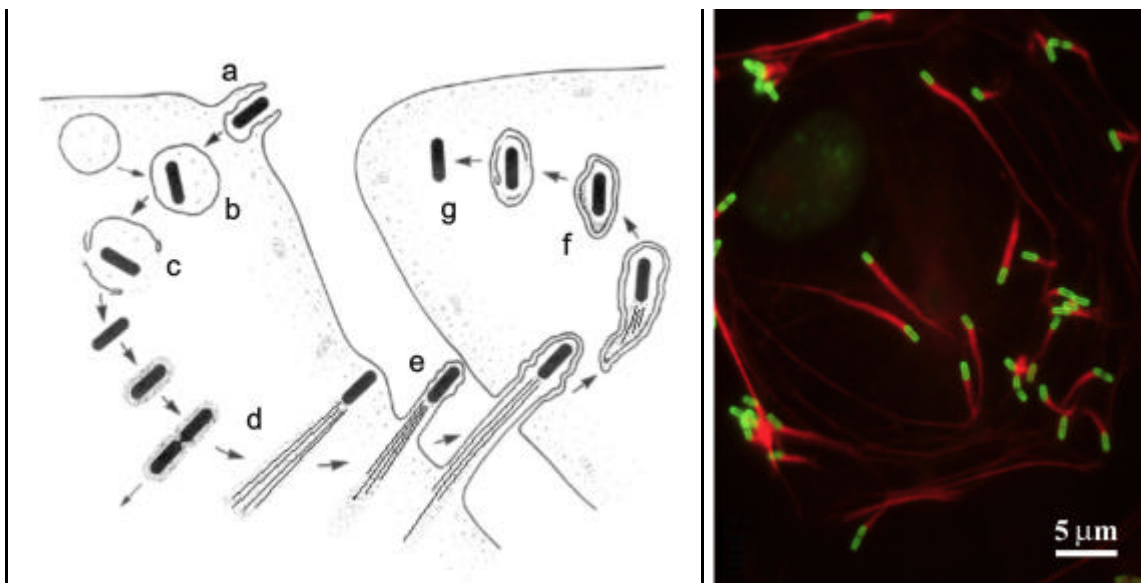


Abbildung 2: Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Links: schematische Darstellung nach Tilney und Portnoy 1989;

Rechts: PtK2 (Nierenepithel) Zelle nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie lokalisiert Aktinfilamente (rot) und Listerien (grün).

L. monocytogenes zeigt einen charakteristischen Infektionszyklus, der auf zellulärer Ebene erstmals im Detail von Tilney und Portnoy (Tilney and Portnoy 1989) beschrieben wurde (siehe Abbildung 2). Die Expression der Virulenzgene wird über den positiven Regulationsfaktor (PrfA) reguliert (Leimeister-Wächter et al. 1990). Die Promotoren der Virulenzgene unterliegen einer Thermoregulation. Das Optimum der Expression der listeriellen Virulenzgene liegt bei 37°C (Leimeister-Wächter et al. 1992).

Die Besonderheit des Aufnahmemechanismus von *Listeria monocytogenes* in eukaryonte Zellen ist darauf zurückzuführen, daß auch nicht phagozytierende Zellen infiziert werden können. Für die Adhäsion und die darauf folgende Invasion der Listerien in nicht phagozytierende Zellen sind im Wesentlichen die Internaline A und B verantwortlich (a in Abbildung 2) (Gaillard et al. 1991, Dramsi et al. 1993 und Lingnau et al. 1995). Als bekannte zelluläre Bindungsproteine dienen für das Internalin A das E-Cadherin (Mengaud et al. 1996) und für Internalin B das Sulfatid Galactosylceramid-3-Sulfat (Müller 1999) bzw. das Membranprotein gC1q-R/p32 (Braun et al. 2000). Listerien sind nach der Invasion in die Zelle zuerst in dem Phagosom (b in Abbildung 2) eingeschlossen. Durch die Sekretion von Listeriolysin (Hly), ein SH-aktivierbares hämolytisches Zytolysin, können Listerien die Membran des Phagosoms permeabilisieren (c in Abbildung 2) (Geoffroy et al. 1987, Chakraborty et al. 1988). Neben Listeriolysin sind noch weitere listerielle Proteine wie die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase A (Plc A) an dem Entkommen aus dem Phagolysosom beteiligt (Camilli et al. 1993). Die nun im Zytoplasma freiliegenden Listerien können sich einerseits vermehren, andererseits werden Aktinfilamente aus dem Zytoplasma der Wirtszelle auf der Bakterienoberfläche akkumuliert (d in Abbildung 2). Das dafür essentielle Protein ist der Aktin-Nukleationsfaktor (ActA) (Domann et al. 1992, Kocks et al. 1992). ActA ist ein listerielles Oberflächenmolekül, das sekretiert und durch einen Membrananker in der Bakterienzellmembran zurückgehalten wird.

Durch die Polymerisation von Aktin und das Zusammenspiel anderer zellulärer Proteine, wie beispielsweise dem Arp2/3-Komplex, α -Actinin, der Ena/VASP-Proteinfamilie und Profilin bilden sich an dem posterioren Pol der Listerien F-Aktinfilamente aus. Mit Hilfe der Polymerisation, die an einem Bakterienpol stattfindet, schieben sich die Listerien durch das Zytoplasma (Mogilner et al. 1996). Die Listerien können hierbei eine Geschwindigkeit von bis zu 1,4 $\mu\text{m/s}$ erreichen (Sanger et al. 1992, Theriot et al. 1992, Cossart et al. 1994). Die Aktinfilamente innerhalb des intrazellulären Schweifes setzen sich aus vernetzten Aktinfilamenten zusammen (Tilney et al. 1990, Tilney et al. 1992 a, b). Die Listerien stoßen durch ihre Bewegung innerhalb der Zelle an die Zellmembran und bilden dadurch Ausstülpungen, sogenannte „protrusions“ (e in Abbildung 2), in denen die Aktinfilamente von der Mitte des Schweifes langgestreckt und nach außen hin verkürzt angeordnet sind (Sechi et al. 1997). Durch die Bildung der „protrusions“, die von Nachbarzellen phagozytiert werden, ist es den Listerien möglich, benachbarte Zellen zu infizieren (f in Abbildung 2). Am Entkommen aus dieser Doppelmembran ist unter anderem eine weitere Phospholipase, die Phosphatidylcholin (Lezithin)-spezifische Phospholipase C, beteiligt (Vazquez-Boland et al. 1992). Die Listerien liegen nun wiederum im Zytoplasma frei vor, der Zyklus kann erneut beginnen (g in Abbildung 2).

1.2.2 ActA

Der Aktin-Nukleationsfaktor (ActA) wurde als alleiniges, listeriell Protein identifiziert, das für die Akkumulierung von Aktin und die Schweifbildung im Zytoplasma der infizierten Zelle verantwortlich ist. Mutanten, denen ein intaktes *actA*-Gen fehlt, ist die Fähigkeit zur aktinvermittelten, intrazellulären Bewegung genommen und sie sind somit nicht zur Ausbreitung von Zelle zu Zelle fähig (Domann et al. 1992, Kocks et al. 1992). ActA ist 639 Aminosäuren lang, mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Im Zytoplasma der Wirtszelle wird ActA durch Wirtszellkinasen phosphoryliert (Brundage et al. 1993), wobei es sich um Serin/Threonin-Phosphorylierungen handelt (Frischknecht et al. 1998). ActA kann in drei charakteristische Domänen eingeteilt werden (siehe Abbildung 3). Die N-terminale Domäne enthält eine Signalsequenz (AS 1-29) und Regionen für die Aktinrekrutierung, eine prolinreiche Repeatregion (AS 265-390), die das sich vierfach wiederholende Aminosäuremotiv FPPPTD trägt, und eine C-terminale Domäne, die von einem Membrananker (AS 613-639) terminiert wird. Durch den Einsatz eines Mitochondrien-Targeting-Systems konnte die Interaktion zwischen Komponenten des Mikrofilamentsystems und ActA auf bestimmte Bereiche von ActA reduziert werden (Pistor et al. 1995).

Die differenzierte Wirkungsweise von ActA in der Nukleation und Polymerisation von Aktin konnte bisher nicht endgültig geklärt werden. Die im ActA N-Terminus liegende Aminosäuresequenz 146-150 wurde als die Aktinnukleationsdomäne identifiziert (Pistor et al. 1995, Lasa et al. 1997). Durch die Einführung einer Punktmutation innerhalb des positiv geladenen „clusters“ kann die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes und des Aktins verhindert werden (Pistor et al. 2000). Der Mechanismus, der durch die Rekrutierung von Aktin und des Arp2/3-Komplexes an ActA zur Aktinfilamentbildung führt, ist unbekannt. Hinweise auf diesen Mechanismus konnten durch Homologievergleiche der oben erwähnten Aminosäuresequenz von ActA und Proteinen der WASP-Familie (Wiskott Aldrich Syndrom Protein) erhalten werden. Es wird daher angenommen, daß ActA ebenfalls an den Arp2/3-Komplex binden kann (Miki et al. 1996, Bear et al. 1998, Miki et al. 1998, Machesky et al. 1999, May et al. 1999, Rohatgi et al. 1999, Winter et al. 1999, Yarar et al. 1999).

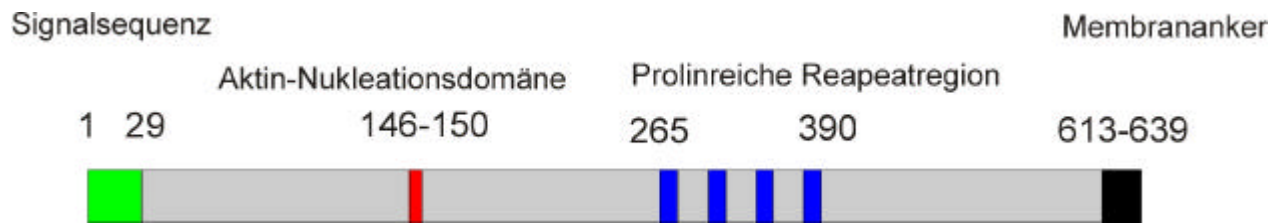


Abbildung 3: Schematische Darstellung des listeriellen Oberflächenproteins ActA mit seinen funktionellen Domänen.

In dem Aminosäurebereich 62-103 von ActA konnte durch Kosedimentation mit synthetischen Peptiden eine Bindung an Aktin nachgewiesen werden (Lasa et al. 1997). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, daß innerhalb des Aminosäurebereiches 213-231 des ActA Moleküls Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) oder Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) bindet (Cicchetti et al. 1999, Steffen et al. 2000).

Der andere Zytoskelettprotein-rekrutierende Bereich (AS 265-613) von ActA umfaßt die prolinreichen Motive. Das FP4-Motiv, auch als „actin-based-motility-1“ (ABM-1) Sequenz bezeichnet (Purich et al. 1997), liegt in einer vierfachen Wiederholung vor und befindet sich in leicht abgewandelter Sequenz in den Zytoskelettproteinen Vinculin, Zyxin und Fyb/SLAP wieder (Geiger et al. 1979, Beckerle et al. 1986, Domann et al. 1992, Golsteyn et al. 1997, Krause et al. 2000). Zelluläre Bindungspartner der Zytoskelettproteine Zyxin und Vinculin, die an das polyprolinreiche-Motiv binden, sind die Mitglieder der Ena/VASP-Familie (siehe dazu 1.3.2). *In vitro* und *in vivo* Daten zeigten, daß das listerielle ActA-FP4-Motiv effektiver an die Ena/VASP-Familie bindet. Folglich sind die eukaryonten Proteine Vinculin und Zyxin in ihrem Bindungsverhalten zu den natürlichen zellulären Bindungsproteinen dem listeriellen Protein unterlegen (Niebuhr et al. 1997b). Zwischen der Ena/VASP-Familie und ActA konnte eine direkte Bindung nachgewiesen werden (Chakraborty et al. 1995, Niebuhr et al. 1997b, Carl 1998). Durch diese Bindung konnte der erste zelluläre Faktor identifiziert werden, der eine Verbindung zwischen intrazellulären Listerien und dem Mikrofilamentsystem der Wirtszelle herstellt. Chromosomale Deletionsmutanten des Proteins ActA, die die gesamte polyprolinreiche Repeatregion nicht mehr enthielten, konnten weiterhin Aktin rekrutieren und sich intrazellulär bewegen, allerdings bildeten sie kürzere Schweife aus. Videoaufnahmen von infizierten Zellen zeigten, daß sich diese Listerien wesentlich langsamer bewegen als der Listerien Wildtyp (Niebuhr et al. 1997b). Hieraus wurde gefolgert, daß die prolinreiche Repeatregion von ActA nicht notwendig für die Aktinrekrutierung ist, jedoch eine Effektorfunktion für die intrazelluläre Bewegung der Listerien besitzt.

1.3 Wirtszelliganden von ActA

1.3.1 Der Arp2/3-Komplex

Der Arp2/3-Komplex enthält sieben Proteinuntereinheiten, wobei zwei Untereinheiten, Arp2 und Arp3, eine 30-60%ige Homologie zu Aktin besitzen. Identifiziert wurde der Komplex (siehe Abbildung 4) durch Affinitätschromatographie über Profilin aus einem Extrakt von *Acanthamoeba* (Machesky et al. 1994, Mullins et al. 1998). Der Arp2/3-Komplex konnte bisher nicht nur in *Acanthamoeba*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharosmyces pombes* und *Dictyostelium* mit starker Homologie zueinander identifiziert werden (Moreau et al. 1996, Mc Collum et al. 1996, Machesky and Gould 1999), sondern auch in unterschiedlichen Säugerspezies.

In Zellen wurde der Arp2/3-Komplex in dynamischen Aktinstrukturen nachgewiesen. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde der Arp2/3-Komplex in Amöben in der aktinreichen Peripherie (Machesky et al. 1994, Kelleher et al. 1995), in aktinreichen Flecken („actin patches“) und in Aktinfasern von *S.cerevisiae* und *S.pombe* lokalisiert (Moreau et al. 1996, Mc Collum et al. 1996). Der Arp2/3-Komplex nukleiert Aktinfilamente, schützt die „pointed ends“ und fügt diese zu einem orthogonalen Netzwerk zusammen (Mullins et al. 1998, Svitkina et al. 1999).

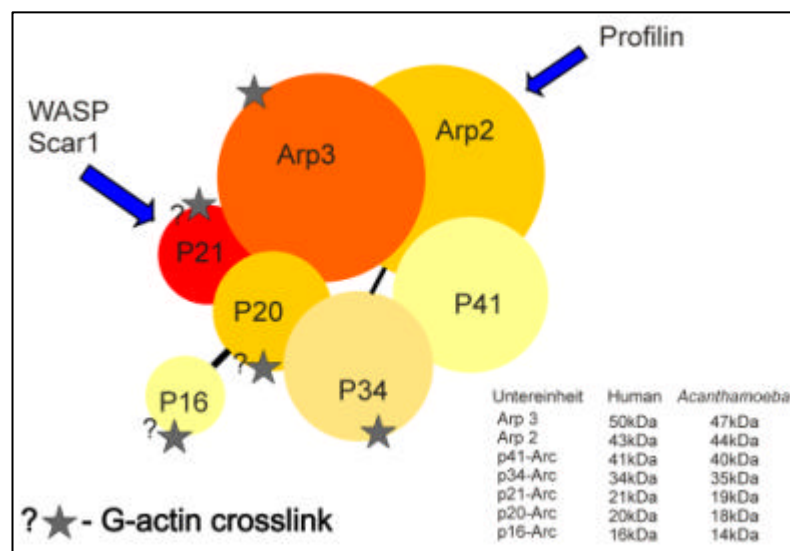


Abbildung 4: Modellstruktur des Arp2/3-Komplexes mit Bindungspartnern nach Mullins et al. (1997). Die direkten Bindungspartner mit den *Acanthamoeba* Proteinen des Arp2/3-Komplexes sind dargestellt, wie Profilin und die Untereinheit Arp2. Ebenfalls konnte eine Bindung zwischen G-Aktin an den Proteinen Arp3 und p34-Arc festgestellt werden. Die Bindung zwischen G-Aktin und den Untereinheiten p21-Arc, p20-Arc und p16-Arc wurde über „crosslinking“-Experimente festgestellt. Die Interaktion zwischen WASP und SCAR1 an p21-Arc wurde in dem Zwei-Hybridsystem mit humanen Proteinen nachgewiesen (Machesky et al. 1998).

Einen Hinweis auf die besondere Bedeutung des Komplexes gibt der Befund, daß der Komplex in der Bäckerhefe für die Lebensfähigkeit der Zelle zwingend notwendig ist (Winter et al. 1997). Durch den Einsatz des Zwei-Hybridsystems (Machesky et al. 1998) und von „crosslinking“-Experimenten (Mullins et al. 1997) wurde ein Modell des Komplexes erstellt.

Der Arp2/3-Komplex aus Säugern bindet über die p21-Arc-Untereinheit an den C-Terminus von WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein) und SCAR1 (Suppressor des cAMP Rezeptors), die beide der WASP-Proteinfamilie angehören (Machesky et al. 1998). WASP wurde ursprünglich als das Protein identifiziert, dessen Mutation für das Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) verantwortlich ist (Derry et al. 1994). WASP gilt als ein Adapterprotein, welches das Signal von Tyrosinkinaserzeptoren und kleinen GTPasen zum Aktinzytoskelett weiterleitet (Carlier et al. 1999).

Zur Zeit sind verschiedene Arbeitsgruppen damit beschäftigt, die Rolle des Arp2/3-Komplexes für die Polymerisation und Quervernetzung von Aktinfilamenten zu untersuchen. Svitkina et al. (Svitkina et al. 1999) erstellten ein Modell, in dem der Arp2/3-Komplex und die ADF/Cofilin Familie antagonistische Wirkungen haben. Der Arp2/3-Komplex ist verantwortlich für den Einbau neuer Aktinfilamente in das Aktin Netzwerk der Lamellipodien und stabilisiert die „pointed ends“ vor der Depolymerisation, während die ADF/Cofilin Familie antagonistisch die Auflösung der Filamente fördert. Dabei wird beschrieben, daß der Abbau der Aktinfilamente durch die Dissoziation des Arp-2/3 Komplexes stattfindet.

Intrazelluläre Listerien rekrutieren den Arp2/3-Komplex an ihre Oberfläche unter der notwendigen Beteiligung von ActA. Eine direkte Bindung zwischen ActA und dem Arp2/3-Komplex konnte allerdings über Bindungsstudien bisher nicht nachgewiesen werden. *In vitro* Studien zeigten, daß ActA und der Arp2/3-Komplex gemeinsam eine Rolle bei der Aktinfilamentbildung spielen. Aufgereinigter Arp2/3-Komplex ist in der Lage, die Geschwindigkeit der Aktinpolymerisation zu verstärken. ActA besitzt hingegen alleine keinen Einfluß auf die Polymerisation. Wird gereinigter Arp2/3-Komplex zusammen mit dem N-Terminus von ActA und G-Aktin inkubiert, so ist die Aktinnukleation bedeutend verstärkt (Welch et al. 1998).

1.3.2 Die Ena/VASP-Proteinfamilie

Die Ena/VASP-Proteinfamilie umfaßt das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), mammalian Ena (Mena) und das „Ena-VASP-like“ Protein (EVL). VASP wurde ursprünglich als ein *in vivo* Substrat für cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen in Thrombozyten identifiziert (Halbrügge et al. 1989, Halbrügge et al. 1990). Die weiteren Mitglieder der Proteinfamilie wurden über das homologe Drosophila Protein Ena (Gertler et al. 1996)

identifiziert. Auf Grund der starken Homologie der EVH1-, EVH2- (Ena/VASP homology) Domänen und der zentralen prolinreichen Region, die in unterschiedlicher Anzahl das G(P)5-Motiv besitzen (siehe Abbildung 5), werden die oben genannten Proteine zur Ena/VASP-Proteinfamilie zusammengefaßt (Gertler et al. 1996). Die Proteine Mena, VASP und EVL zeigen eine Gewebe-spezifische Expression. Während Mena und EVL im neuronalen Gewebe stark exprimiert werden, liegt VASP in einer erhöhten Konzentration in Thrombozyten vor. Mena konnte dort nicht nachgewiesen werden. In der Zelle sind Mena und VASP in „focal contacts“, Streßfasern, Adhäsionsverbindungen und stark dynamischen Bereichen, wie der Führungslamelle von Lamellipodien, lokalisiert (Reinhard et al. 1992, Gertler et al. 1996, Rottner et al. 1999).

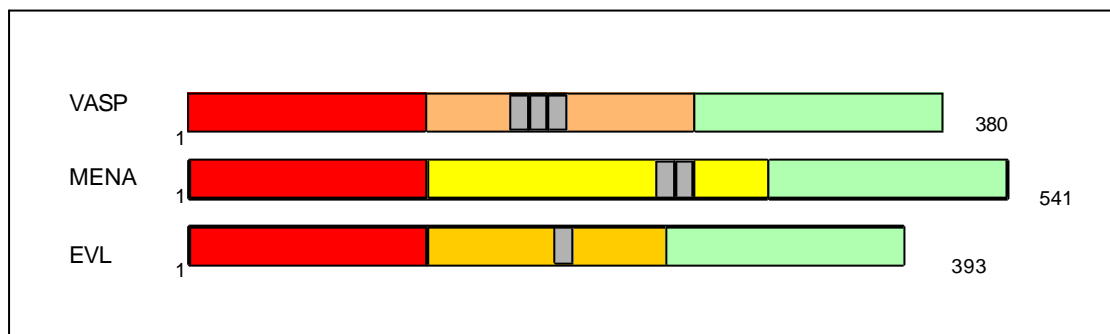


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ena/VASP-Proteinfamilie.

EVH1-Domäne – rot
prolinreiche G(P)5-Sequenzen – gelb
EVH2-Domäne -grün

Als zelluläre Bindungspartner der Ena/VASP-Proteinfamilie wurden Zyxin (Gertler et al. 1996, Niebuhr et al. 1997b), Vinculin (Brindle et al. 1996, Reinhard et al. 1996) und Fyb/SLAP (Krause et al. 2000) identifiziert, deren prolinreiche Regionen mit der EVH1-Domäne interagieren. Ebenfalls über die homologen prolinreichen Motive findet die Bindung zwischen dem listeriellen Protein ActA und der EVH1-Domäne statt (Chakraborty et al. 1995, Niebuhr et al. 1997b, Carl et al. 1999). Das Protein Profilin bindet an das zentrale G(P)5-Motiv von VASP und Mena (Reinhard et al. 1995, Gertler et al. 1996). Die EVH2-Domäne konnte über das Zwei-Hybridsystem als eine Multimerisierungsdomäne identifiziert werden. Außerdem zeigten *in vitro* Versuche eine Bindung an Aktinfilamente (Hüttelmaier et al. 1999, Bachmann et al. 1999).

1.4 Die Dynamik von Zytoskelettproteinen

Proteine können in einem momentanen Zustand innerhalb der Zelle durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert und lokalisiert werden, jedoch kann keine Aussage über die Dynamik der Proteine oder ihre Lebensdauer gemacht werden. Durch die Kopplung von aufgereinigten Proteinen an Fluoreszenzfarbstoffe können über Mikroinjektion die Proteine in die Zelle eingebracht und beobachtet werden, wobei die aufgereinigten Proteine aus tierischen Geweben isoliert oder rekombinant hergestellt werden müssen. Diese gesamte Methode ist sehr aufwendig und nicht immer erfolgreich. Weiterhin unterliegen die Proteine sowohl während der Aufreinigung als auch innerhalb der Zellen einer starken Proteolyse, was Langzeituntersuchungen nur eingeschränkt ermöglicht.

Durch die Klonierung des gewünschten Gens in bestimmte Vektoren kann das entsprechende Protein an ein fluoreszierendes Photochrom fusioniert werden, das direkt in der Zelle exprimiert wird.

Eines dieser fluoreszierenden Chromophore ist das grün fluoreszierende Protein (GFP), dessen Gen aus einer im Nordwest-Pazifik vorkommenden Quallenart, *Aequorea victoria*, isoliert wurde. An die 238 Aminosäuren lange Primärsequenz des 27 kDa großen Proteins kann sowohl C-, wie N-terminal das gewünschte Fusionsprotein kloniert und in diversen pro- und eukaryontischen Systemen exprimiert werden. Dieses System bietet viele Möglichkeiten z.B. in Kombination mit der digitalen Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation und Dynamik der GFP-Fusionsproteine in lebenden Zellen zu untersuchen (Ballestrem et al. 1998, Rottner et al. 1999, Geese et al. 2000).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Listerien haben einen effektiven Mechanismus entwickelt, die Bewegungsmaschinerie der Wirtszellen zu übernehmen bzw. auszunutzen. Das Prinzip der Aktinfilamentbildung auf der Oberfläche der Listerien ist vergleichbar mit den Vorgängen der Aktinfilamentdynamik in Zellen, wie sie z.B. in Lamellipodien an der Plasmamembran zu finden sind. Durch die Studien an ActA und den assoziierten zellulären Wirtszellproteinen können nicht nur Rückschlüsse auf die Interaktionen des Pathogens mit den Proteinen des Zytoskeletts und den assoziierten Proteinen des Mikrofilamentsystems gezogen, sondern vielmehr auch die Funktion und die Mechanismen abgeleitet werden, die innerhalb der Zelle ablaufen. ActA kann als ein Protein gesehen werden, welches die essentiellen Proteinmotive in sich vereinigt, damit eine effektive aktinvermittelte Bewegung stattfindet. Die funktionellen Regionen des ActA können daher Sequenzen aufweisen, die sich in Wirtszellproteinen wiederfinden und Bindungsregionen für zelluläre Proteine darstellen.

Eine Unterstützung bei der Charakterisierung der Wirtszellzytoskelettproteine bilden GFP-Fusionsproteine, die sowohl in dem listeriellen Modellsystem, wie auch in dynamischen Zellen durch ihre spezifische Lokalisation und Dynamik Hinweise auf die Aktinfilamentdynamik geben.

Die vorliegende Arbeit hat die folgenden Ziele:

- 1) funktionelle Untersuchung einer zu Beginn der Arbeit postulierten Aktinfilament-bindenden Region im ActA Protein mit vorhandenen und in dieser Arbeit neu hergestellten Antikörpern. Weiterhin war es notwendig, diese analogen Wirtszellproteine, die von funktionell wirkenden ActA Antikörpern erkannt werden, zu identifizieren und eine zumindest partielle Charakterisierung durchzuführen;
- 2) monoklonale und polyklonale Antikörper gegen GFP herzustellen, die zur Analyse in elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie biochemischen und immunchemischen Nachweismethoden eingesetzt werden können;
- 3) GFP-Fusionsproteine Aktin, p21-Arc, Arp3, VASP, Mena und Fragmente des Proteins Mena sollten in dieser Arbeit in dem listeriellen System und in Zellen eingesetzt werden, um die Lokalisation und Dynamik der Proteine zu analysieren und zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Reinheitsgrade „p.a.“, „reinst“ bzw. „für mikrobielle Medien“ der Firmen Baker, Bayer, Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, Merck, Pharmacia, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma verwendet.

Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, das mit einem MilliQ-System (Millipore) aufbereitet wurde. Medien, Medienzusätze und Pufferlösungen wurden autoklaviert (30 min., 121°C) oder, wenn sie Hitze empfindlich waren, sterilfiltriert (0,22 µm) und dem gekühlten Medium zugesetzt.

2.2 Mikrobiologische Kulturen

2.2.1 *Escherichia coli*

Medien

LB-Medium (Luria Bertani broth):

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	7 g/l

LB-Agarplatten:

16 g Bacto-Agar werden in 1l LB-Medium eingewogen, aufgekocht und handwarm in Petrischalen gegossen.

Verwendete *Escherichia coli* Stämme

TG2: supE hsd^r thi⁻ (lac-proAB)⁻ (srI-recA)306: Tn10(tet^R)/F⁻ (traD36 proAB⁺ lacLlacZ⁻ M15)

BL21 (DE): *E. coli* B, F⁻, dcm, ompT, hsdS(rB⁻ mB⁻) gal (DE3)

BL21 (DE3)pLysE: F⁻, ompT hsdS_B(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pLysE (Cm^R)

BM 25.8: [F⁻ traD36 lacI^q lacZ⁻ M15 proA⁺ B⁺] supE thi⁻ (lac-proAB) P1Cm^R hsdR (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) (λimm⁴³⁴ Kan^R)

TOP 10 F⁻: F⁻ (lacIq Tn10(Tet^R)) mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

2.2.2 Listerien

Medien

BHI-Medium:

Brain-Heart-Infusion 37 g/l

BHI-Agarplatten:

16 g Bacto-Agar werden in 1l BHI-Medium eingewogen, aufgekocht und handwarm in Petrischalen gegossen.

Selektionsmarker

5 µg/ml Erythromycin

verwendete Listerienstämme

a) Wildtyp-Stamm:

Listeria monocytogenes EGD: human- und tierpathogen, schwach hämolytisch, Serotyp 1/2a (Leimeister-Wächter et al.1989)

b) isogene, chromosomale Deletionsmutanten des *actA*-Gens(Chakraborty et al.1995)

Δ ActA2 Deletion der AS 20-602

c) Komplementationsmutanten (Selektionsmarker Erythromycin)

L.monocytogenes EGD (+prfA7973): trägt auf einem Plasmid (Vektor pERL) zusätzlich das *prfA*-Gen von *L.monocytogenes* NCTC 7973

L.monocytogenes EGD Δ*actA2* (+prfA7973): verkürztes oder deletiertes chromosomales *actA*-Gen mit zusätzlichem Plasmid (Vektor pERL) des *prfA*-Gens von *L.monocytogenes* NCTC 7973

2.2.2.1 Vorbereitung der indirekten Immunfluoreszenz von *Listeria monocytogenes*

Die Deckgläser werden über Nacht mit Poly-L-Lysin 10 mg/ml 1:1000 beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Eine Übernachtskultur des gewünschten Listerienstammes wird 1:5 in warmem BHI-Medium verdünnt und bei 37°C 4 Stunden inkubiert, damit sich die Bakterien in einer logarithmischen Wachstumskurve befinden. 1 ml wird entnommen und bei 1000g anzentrifugiert. Das Sediment wird mit PBS gewaschen und 1:1000 bzw. 1:2000 verdünnt auf die vorbereiteten Deckgläser zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT). Anschließend werden die Listerien mit der gewünschten Fixierung für die indirekte Immunfluoreszenz behandelt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Verwendete Vektoren

pGEX-6P1	Pharmacia	GST-Fusionsprotein für bakterielle Expression
pEGFP-N1	Clontech	GFP-Fusionsprotein C-terminal für eukaryonte Transfektion
pEGFP-C2	Clontech	GFP-Fusionsprotein N-terminal für eukaryonte Transfektion
pEXlox	Novagen	Plasmid, das durch die P1 cre Recombinase aus den λ Exlox Phagen entsteht

pCRII-TOPO Invitrogen

Verwendete Konstrukte

p124-VASP: 1-380 AS in pEGFP-N1

p144-VASP: 153-380 AS in pEGFP-N1

p241-Mena: 1-541AS in pEGFP-C2

p133-Mena: 1-114 AS in pEGFP-N1 von Dr. U. Carl zur Verfügung gestellt

p21-Arc und Arp3 in gesamter Genlänge, sowohl in pEGFP-N1, wie auch pEGFP-C2, wurden von L. Gröbe zur Verfügung gestellt

Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5'→3'
M13-5'	-GTA AAA CGA CGG CCA GT-
M13-3'	-CAG GAA ACA GCT ATG AC-
EGFPC-5'SQ	-GGT CCT GCT GGA GTT CGT-
5'TH SQ	-ATG GGT GAG TCA AGT GAA GAC-
3'TH SQ	-GTC TTC ACT TGA CTC ACC CAT-
SQ5' TH300	-TCC AGG CAC AGA AAG AGT-
SQ3' TH300	-ACT CTT TCT GTG CCT GGA-
SQ5' TH800	-GAC TGG ACA AGA GAC ACA GA-
SQ3' TH800	-TCT GTG TCT CTT GTC CAG TC-
RTprp48-5'	-GCG CCC CGC AGA GCA GTC-
RTprp48-3'	-TTC ATA AGG TAG GTT GTC AGT-
Prp5 N1Hi	-CCC CGC AGA AAG CTT GAG ATG GGT GAG T
Prp48N13' Ec2	-TAA GGT AGG AAT TCC GTA CAG TCT-

Tabelle 1: Zusammenfassung der genutzten Oligonukleotide

Medien

SOB-Medium:	Bacto-Trypton	20 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,6 g/l
	KCL	0,19 g/l

SOC-Medium:

In SOB-Medium werden 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose zugefügt.

Selektionsmarker:

Je nach verwendetem Plasmidvektor

100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 5 µg/ml Erythromycin

2.3.1 Klonierung von DNA Konstrukten

2.3.1.1 Dephosphorylierung von Vektoren mit alkalischer Phosphatase

Verwendete Puffer:

10x Dephosphorylierungspuffer:	Tris-HCl, pH 8,5	500 mM
	EDTA	1 mM

Linearisierte Vektoren, in die ein DNA-Insert eingeführt werden soll, werden dephosphoryliert, um eine Rückligation des Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierung wird durch die alkalische Phosphatase durchgeführt. Dieses Enzym spaltet von den 5'-Enden des Vektors die Phosphatgruppen ab. Das Schließen des Vektors ist nur noch durch den Einbau eines nicht phosphorylierten Inserts möglich, welches die nötigen Phosphatgruppen mitbringt.

In einem Endvolumen von 15-100 µl werden folgende Lösungen vermengt:

DNA	2-3 µg
10x Dephosphorylierungspuffer	1/10 Volumen
alkalische Phosphatase	1 Unit

Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend eine weitere Unit der alkalischen Phosphatase hinzugefügt und nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die alkalische Phosphatase zu entfernen wird der Ansatz über Agarosegelelektrophorese und Elution des dephosphorylierten Vektors aufgereinigt.

2.3.2 Transformation von Ligationsansätzen und Plasmiden in *E.coli*

2.3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien (Dagert M. et al. 1979)

Eine Übernachtskultur (on) von *E.coli* TG2 wird in 100 ml SOB-Medium so verdünnt und bei 37°C geschüttelt, daß sich nach ca. 1-2 h die Bakterien in der logarithmischen Phase (OD₆₀₀= 0,5) befinden. Durch Zentrifugation (5000xg, 5-10 min) werden diese geerntet. Das Pellet wird in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt werden die Bakterien in 1 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und für ca. 8 h auf Eis inkubiert. Diese kompetenten Bakterien können entweder direkt transformiert werden oder mit 10% (v/v) sterilem Glycerin bei -70°C aliquotiert gelagert werden. Vor Gebrauch werden sie langsam auf Eis gelagert aufgetaut.

2.3.2.2 allgemeine Ligation mit T4-DNA-Ligase

Linearisierter, dephosphorylierter Vektor und linearisiertes Insert werden über Agarosegel einer Mengenabschätzung unterzogen. Die Menge Insert wird in Überschuß zum Vektor eingesetzt. In einem Volumen von 15 µl mit 10x Ligationspuffer und 1 Unit T4-DNA-Ligase vermischt. Der Ligationsansatz wird bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.3.2.3 Transformation

Pro Transformation (0,5 µg Plasmid oder 7 µl Ligationsansatz) werden 100 µl kompetente Bakterien mit der gewünschten DNA für 10-15 min auf Eis inkubiert. Folgend wird die Probe für 5 min auf 37°C schnell erwärmt, um anschließend die Probe wieder auf Eis für 15 min zu inkubieren. Diese Schritte werden noch einmal wiederholt. Zur Regeneration der Bakterien werden die Ansätze mit 800 µl SOC-Medium verdünnt und 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Kultur wird 1 min bei 13000xg zentrifugiert, das Pellet in 200 µl SOC aufgenommen, auf Selektivmedium-Agarplatten mit Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Einzelkolonien werden in 2-3 ml Flüssigmedium kultiviert und die Plasmid-DNA wird für eine „Mini-Präparation“ bei 37°C für 8 h leicht schüttelnd angezogen.

2.3.3 Arbeiten mit DNA

2.3.3.1 DNA-Isolierung

Mini-Präparation von DNA (Birnboim & Doly 1979)

verwendete Lösungen:

GET-Puffer:	Glukose	50 mM
	EDTA	10 mM
	Tris-HCl. pH 8,0	25 mM
Lysispuffer	NaOH	0,2 mM
	SDS	1% (w/v)
Lösung III	Ammoniumazetat	7,5 M

Von 2 ml einer Übernachtskultur werden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß gefüllt und für 1 min bei 13000xg zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird mit 150 µl GET-Puffer aufgenommen und gelöst. Anschließend werden 200 µl des frisch hergestellten Lysispuffers hinzupipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. 150 µl der Ammoniumacetatlösung werden hinzupipettiert, was dazu führt, daß Zelltrümmer, Proteine, RNA und genomische DNA gefällt werden. Diese werden für 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend bei 13000xg für 30 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und phenolisiert. Die in der wäßrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wird mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und dann pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Für einen Restriktionsverdau werden 8 µl DNA eingesetzt.

Plasmid-DNA-Midi- und Maxi-Präparation

Um Transfektions geeignete DNA im größeren Maßstab zu erhalten wird die Plasmid-DNA nach QIAgen-Midipräparations oder –Maxipräparations Protokoll (QIAgen) aufgereinigt.

2.3.3.2 Restriktionsanalyse von DNA

Durch natürlich vorkommende oder gesetzte Restriktionsschnittstellen kann die (Plasmid-) DNA in spezifische Fragment geschnitten werden. Hierzu wird der Restriktionsverdau mit :

10x Puffer	1/10
Restriktionsenzym	1U pro 1 µg DNA
DNA-Lösung	
H ₂ O	ad 20-100 µl angesetzt.

Die Restriktionspuffer werden von dem jeweiligen Hersteller des Restriktionsenzym verwendet. Der Reaktionsansatz wird bei 37°C (d.h. bei der optimalen Reaktionstemperatur des Enzyms) für mindestens 1 Stunde inkubiert.

2.3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Lösungen:

50x TAE-Puffer:	Tris-Base	2M	
	Natriumazetat	1M	
	EDTA	50 mM	pH 7,5
5x STOP:	Ficoll	15% (v/v)	
	EDTA	50 mM	
	SDS	0,4% (w/v)	
	50xTAE-Puffer	20 µl	
	Xylenblau	0,05% (w/v)	
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)	

1-2% Agarose, je nach aufzutrennender Größe der DNA-Fragmentstücke, wird mit 1xTAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und gelöst, anschließend mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) mit einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml versetzt. Lineare DNA-Fragmente lassen sich nach ihrer molekularen Größe auftrennen. Die DNA-Fragmente werden vor dem Auftrag auf das Agarosegel mit ¼ Volumen von 5x STOP versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 50-100 V durchgeführt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, wodurch es möglich ist, das Gel unter UV-Licht auszuwerten, und es mit dem >>E.A.S.Y.-System<< (Herolab) als Videoprints dokumentiert werden kann.

2.3.3.4 Agarose-Gel-Elution

Das zu eluierende DNA-Fragment wird nach Restriktionsverdau in einer Agarosegelelektrophorese von den anderen Fragmenten aufgetrennt, unter UV-Licht Beobachtung mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktions Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das ausgeschnittene Gelstück wird in dem 3-fachen Volumen Puffer QX-1 bei 50°C unter kräftigem Schütteln aufgelöst. Die Suspension wird auf QIAquick-Spin-Säulen gegeben und bei 13000xg für 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 0,75 ml Puffer PE durch nochmaliges Zentrifugieren gewaschen. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt mit 50 µl H₂O in einem letzten Zentrifugationschritt.

2.3.4 Screening einer cDNA-Expressions-Bibliothek

Verwendete Lösungen Puffer und Agarplatten:

Antibiotika: 34 µg/ml Chloramphenicol; 50 µg/ml Carbenicillin

40% Maltose

1 M MgSO₄ x 7H₂O

SM-Puffer:	5 M NaCl	20 mg/ml	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 g/l	
	1 M Tris-HCl pH7,5	50mg/l	
	Gelatine	100 mg/ml	autoklaviert
2xYT Agarplatte:	Bacto Trypton	16 g/l	
	Hefe Extrakt	10 g/l	
	NaCl	5 g/l	
	Agar	15 g/l	autoklaviert
Top-Agarose:	Bacto Trypton	10 g/l	
	Hefe Extrakt	5 g/l	
	NaCl	5 g/l	
	Agar	6 g/l	autoklaviert

Titern einer Phagen-Bibliothek

Vor der ersten Benutzung einer neuen Phagen-Bibliothek muß ihr Titer bestimmt werden. Dazu wird eine Reihenverdünnung in SM-Puffer angesetzt, die Schritte der Screening Prozedur werden durchgeführt und die Plaques auf den Platten der unterschiedlichen Verdünnungen ausgezählt.

Screening-Prozedur (für die Phagen- Bibliothek, mit ?Exlox Vektor, (Novagen))

Runde 1 (2. und folgende Runden)

- 1) Von einer Einzelkolonie wird eine 50 ml on Kultur von BL21(DE3)pLyse in LB, 0,2% Maltose, 10 mM MgSO₄, 34 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und bei 37°C inkubiert.
- 2) Für die erste Runde werden 5x10⁴pfu (2x10⁴) ("plaque forming units") in 600 µl (200 µl) Bakteriensuspension gemischt und bei 37°C für 30min inkubiert, damit die Phagen an ihre Wirtszellen adherieren können.
- 3) Anschließend werden 8 ml (3 ml) auf 50°C abgekühlte Top-Agarose dazugegeben, gemischt und auf eine 150 mm (82mm) 2xYT Agarplatte gegossen, gleichmäßig verteilt. Die Platten werden bei 37°C für ca. 7 Stunden inkubiert, bis die Plaques eine Größe von ungefähr 0,1-1 mm haben.
- 4) Anschließend werden trockene Nitrozellulosefilter vorsichtig auf die Agarplatten gelegt und weitere 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert

- 5) Die Filter und Agarplatten werden durch schwarze, wasserfeste Tinte asymmetrisch markiert, um eine spätere Zuordnung von Agarplatten und Filter sicherzustellen. Die Filter werden von den Agarplatten abgezogen und wie ein Western Blot weiterbehandelt.
- 6) Die positiven Plaques werden erneut getestet, indem das korrespondierende Agarstück mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen wird und über Nacht bei 4°C in 1 ml SM-Puffer gelöst wird. Dies erfolgt so lange, bis alle Plaques auf einer Platte im Western Blot ein positives Signal zeigen.

„Autosubcloning“

Aus den „gescreenten“ Phagen wird die DNA als Plasmid gewonnen und in den Bakterienstamm BM 25.8 überführt. Die Phagen-DNA enthält ein komplettes Plasmid, das von zwei *loxP* Erkennungsstellen flankiert wird. Wenn die Phagen Bakterienzellen infizieren, die die P1 cre Rekombinase exprimieren (*E.coli* BM25.8), wird das Plasmid durch die Rekombinase an den *loxP* Erkennungsstellen herausgeschnitten und zu einem vollständigen Plasmid ligiert. Unter Antibiotika-Selektion enthalten dann alle Kolonien das entstandene Plasmid. Nach Isolierung des bakteriellen Plasmides können die folgenden Schritte der Restriktionsanalyse, Sequenzierung und Klonierung, die zu der Identifizierung des „gescreenten“ Klon führen, angeschlossen werden.

Dazu wird eine on Kultur des *E.coli* Stammes BM25.8 mit einer entsprechenden Verdünnung der isolierten, gereinigten Phagen gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert, damit die Phagen an ihre Wirtszelle adherieren können. Diese Mischung wird direkt auf eine LB-Agarplatte (50 µg/ml Carbenicillin) verteilt und bei 37°C on inkubiert.

2.3.5 Arbeiten mit RNA

Total-RNA Isolierung

Puffer:

TSM/NP-40:	10 mM	Tris/HCL, pH7,5
	0,15 M	NaCl
	2 mM	MgCl ₂
	0,5%	NP-40

GTC Puffer:	4 M	Guanidin-rhodanid
	10 mM	Tris/HCL, pH7,5
	0,15 M	NaCl
	5 mM	EDTA; auf pH 7,5 einstellen
	frisch zusetzen 0,1 M β-Merkaptoethanol	

Die entsprechende Zelllinie wird in einer 10 cm Gewebekulturschale bis zu Subkonfluität kultiviert. Die Zellen werden durch zweimaliges Waschen mit PBS von toten Zellen befreit, anschließend mit 350 µl TSM/NP-40-Puffer lysiert. Die Zellsuspension wird abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt, welches bei 4°C für 3-5 min inkubiert wird. Nachdem die Kerne sedimentiert sind, wird der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 350 µl GTC-Puffer vorgelegt wurden, und vermischt. Der daraus resultierende Überstand wird mit einer Phenol-Lösung (Firma Roth) vermennt, gemischt und bei 13000xg 30 min 4°C zentrifugiert. Die obere wäßrige Lösung, die die RNA enthält, wird in 1/20 Volumen 3M Naac., pH 5,2 und 800 µl Isopropanol bei -20°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (13000xg ; 30 min; 4°C) wird die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend in 20 µl H₂O aufgenommen und bei -70°C gelagert.

2.3.6 spezielle molekularbiologische Methoden

2.3.6.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *In vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen.

Man geht so vor, daß die Nukleinsäuren, die die zu amplifizierende Sequenz enthalten, mit einem Überschuß von zwei chemisch synthetisierten, spezifischen Oligonukleotiden eingegrenzt werden. Die Oligonukleotide binden jeweils an dem 5'-Ende und 3'-Ende der gewünschten Sequenz.

Durch die Zyklen von Denaturierung des DNA-Stranges, von Annealing der spezifischen Oligonukleotide an den DNA-Strang und von Extension durch die Polymerase, wird der von den Primern eingegrenzte Bereich der DNA logarithmisch amplifiziert.

Die notwendigen Reagenzien wie: 10x PCR-Puffer, Nukleotide (2 mM) und Polymerase werden vom jeweiligen Hersteller benutzt, die Konzentration der DNA beträgt 0,5-1 µg.

2.3.6.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Hier dient als Template total- oder m-RNA, durch die Verwendung von Reversen Transkriptasen kann einzelsträngige RNA von ihr zu einem RNA-DNA-Doppelsträngigen Hybrid aufgefüllt werden. Diese dadurch entstandene c-DNA ist der direkte komplementäre Strang der RNA, was gleichbedeutend mit dem zu translatierenden Bereich ist. Die c-DNA wird direkt als Template

für eine PCR eingesetzt.

Bis zu 5 µg total-RNA werden mit 1 µl Oligo-dT-Primer auf 12,6 µl mit DEPEC-H₂O aufgefüllt und für 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend für 2 min auf Eis gestellt.

Hinzu kommen	4 µl	5x Puffer
	2 µl	0,1 M DTT
	1 µl	10 mM Nukleotid-Mix
	0,4 µl	RNASE-Inhibitor, anschließend wird bei 42°C vorinkubiert

und nach der Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase wird der Ansatz bei 42°C für 45 min inkubiert. Nach der Inkubation werden 40 µl H₂O hinzu pipettiert und bei 90°C für 5 min inkubiert.

2.3.6.3 „Rapid amplification of c-DNA ends“ (RACE)

Die RACE Methode basiert auf der Kombination von RT-PCR und Nested PCR. Für das unbekannte 3'- bzw. 5'-Ende des Gens werden von der Firma Clontech universelle Primer eingesetzt. Das gewünschte Protein oder Gen muß teilweise bekannt sein, da es als Grundlage für die Wahl von spezifischen Primern dient. In der Erststrangsynthese werden zwei unterschiedliche Stränge synthetisiert (siehe Abbildung 15).

3'-RACE: Die RT-PCR wird mit einem genspezifischen Primer und einem Oligo d (T)-Primer durchgeführt, so daß im optimalen Fall nur ein Doppelstrang entsteht, der das 3'-Ende des Gens codiert. Über spezifische Primer, die innerhalb dieser Gensequenz binden, wird eine Nested PCR angeschlossen, die zu der Amplifizierung des spezifischen 3'-Genstückes führt. Der spezifische 3'-Primer wird durch die Firma Clontech geführt, der auf dem ersten 3'-Primer basiert.

5'-RACE: Die RT-PCR wird mit einem genspezifischen Primer und einem C-reichen Primer der Firma Clontech durchgeführt, so daß im optimalen Fall nur ein Doppelstrang entsteht, der das 5'-Ende des Gens codiert. Über spezifische Primer, die innerhalb dieser Gensequenz binden, wird eine Nested PCR angeschlossen, die zu der Amplifizierung des spezifischen 5'-Genstückes führt. Der spezifische 5'-Primer ist G-reich und kann so spezifisch an den 5-Primer binden.

Durch die RACE-Reaktionen sind zwei Genteilsequenzen mit neuen Sequenzinformationen bekannt. Diese neuen Informationen werden über Sequenzierung (2.3.5.4) mehrerer Klone bestätigt. Die Informationen können auf zwei Arten genutzt werden. Zum einen kann aus den Teilsequenzen, die überlappende Sequenzen enthalten, ein Gen durch Annealing und Elongation zusammengefügt werden durch sogenannte „Overlapping-PCR“.

Zum anderen kann eine RT-PCR mit spezifischen Primern für das gesamte Gen angeschlossen werden.

2.3.6.4 DNA-Sequenzierung

Verwendete Puffer:

Taq-Dye-Terminal Cycle Sequenzierungsakit von Applied Biosystems (Weiterstadt), der Puffer enthält sämtliche Lösungen wie die Nukleotide und die Taq-Polymerase.

Die Sequenzierung wird nach dem Prinzip der Dideoxy-Methode von Sanger durchgeführt und basiert auf der Amplifizierung von DNA-Strängen über PCR. Die DNA-Doppelstränge müssen vor der Sequenzierung durch Hitzebehandlung denaturiert und so von einander getrennt werden. Der Einbau von dNTP-Dye Terminatoren, fluoreszenzmarkierten dNTP-Analoga führt zu einem zufälligen Abbruch der Sequenzreaktion. Die Reaktion erfolgt mittels einer zyklischen Sequenzierung, die eine lineare Vermehrung zur Folge hat. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die in einer hochauflösenden Polyacrylamidgelelektrophorese von einander getrennt werden, über eine Laserdiode werden die fluoreszierenden Terminatoren identifiziert und für spätere Analysen zusammengefaßt. Das verwendete Gerät ist das automatische Sequenzer-System von Applied Biosystems (Modell 377).

Reaktionsansatz:	Premix	2 µl	
	DNA	0,5-1 µg	
	Primer	1,6 pmol	
	H ₂ O	ad 10 µl	
Sequenzprogramm:	96°C	15 s	
	50°C	15 s	
	62°C	240 s	25 Zyklen
	62°C	300 s	1 Zyklus
	10°C	unbegrenzt	

Aufreinigung der Sequenzprobe:

Da freie Dioxynukleotide, freie Dideoxynukleotide und überschüssige Primer bei der Auswertung der Gelelektrophoresen stören, werden diese durch Fällung des Ansatzes mit 2 µl 3 M Naac. (pH5,2) und 50 µl Ethanol (100%) entfernt. Der Ansatz wird bei 13000rpm 30 min RT zentrifugiert, das Pellet mit 250 µl 70%Ethanol gewaschen und nochmals 15 min 13000rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 1,5 µl Formamid/EDTA aufgenommen. Kurz vor dem Auftrag auf das Gel wird die Probe auf 95°C erhitzt. Das Gel selbst ist ein 4%, 48 cm langes Acrylamidgel, die Elektrophorese läuft 10,5 h.

Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen werden die Programme ABI Sequenzing Analysis Version 3,2 und DNA star verwendet.

2.3.6.5 TOPO TA Cloning

Um PCR-Fragmente weiter zu bearbeiten, werden sie in den Vektor pCRII-TOPO kloniert. Man macht sich hierbei zunutze, daß die Taq-DNA-Polymerase eine terminale Transferaseaktivität besitzt, d.h. sie hängt Deoxyadenosine an die 3'-Enden der PCR Produkte. Der linearisierte TOPO TA Vektor besitzt 3' überhängende Deoxythymidine, durch diese Bindung zwischen PCR-Produkt und linearisiertem Vektor findet eine effiziente Ligation statt. Die Ligation erfolgt durch eine Topoisomerase, die an den Vektor gekoppelt ist, innerhalb von 5 min bei RT. Der Ligationsansatz wird in *E.coli* Top 10F' transformiert. Durch den Aufbau des Vektors ist eine Selektion durch IPTG-Induktion und X-Galfärbung (blau-weiß Selektion) möglich. Der pCRII-TOPO-Vektor besitzt den Open reading frame (ORF) des Lac-Z-Gens, wird dieser durch die Insertion eines PCR-Produktes gestört, so sind die Kolonien weiß, da kein funktionsfähiges LacZ produziert wird. Blaue Kolonien enthalten religierten Vektor.

2.4. Gewebekultur

Puffer:

Phosphate-buffered-saline (PBS):

2,6 mM KCL
1,5 mM KH₂PO₄
140 mM NaCl
8,3 mM Na₂HPO₄

Laminin-coating-Puffer:

150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Medienzusätze:

Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep):

Penicillin (5000 U/ml)- Streptomycin (5000 µg/ml)-Lösung (Gibco) kann den Medien 1:100 als Kontaminationsschutz zugesetzt werden.

Selektionsmarker:

G418 (Geneticin, Gibco): Stammlösung von 500 mg/ml in H₂O

Verwendete Zelllinien:

PtK2 (Nierenepithelzellenlinie der Kängururatte (*Potorous tridactylis*), ATCC CCL-56)

Caco-2 (humane Epithelzelllinie, ATCC HTB 37)

HeLa (humane, epitheliale Adenokarzinomzelllinie, ATCC CCL 2)

P3X63Ag8.653 (kurz: „Ag8“, murine Myelomzelllinie, ATCC CRL 1580)

B16F1 (Maus Melanomtumor Zelllinie, ATCC CRL-6323)

2.4.1 Allgemeine Gewebekulturarbeiten

2.4.1.1 Kultivierung und Passage

Die Zellen werden in Gewebekultur-Petrischalen (Nunc oder Corning) bei 37°C und 8% (v/v) CO₂ im Brutschrank (Forma Scientific) kultiviert.

Die oben genannten Zelllinien PtK2 und HeLa werden in „Minimal Essential Medium“ mit Earle's Salzen (MEM, Gibco), mit den Zusätzen 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS, Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco) und zusätzlich nicht essentielle Aminosäuren (100x sterile Lösung, Gibco) kultiviert.

B16F1 Zellen erhalten „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM, Gibco) mit 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS, PAA Laboratoris Austria), 2 mM L-Glutamin (Gibco) und zusätzlich nicht essentielle Aminosäuren (100x sterile Lösung, Gibco). Die adhärend wachsenden Zellen werden alle 2 bis 4 Tage passagiert. Nach Spülen mit PBS werden die Zellen von der Zellkultur-Petrischale durch die Behandlung von Trypsin (0,5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA in modifizierter „Puck's Saline“, Gibco) abgelöst.

Ag8-Myelom- und Hybridomzellen (s.u.) werden in OPTIMEN (Gibco) mit 5% (v/v) FCS, 4 mM L-Glutamin (Gibco), 50IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Umsetzen der Zellen werden sie mit einer 20 ml- Pipette kräftig resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

2.4.1.2 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren werden die Zellen in Medium suspendiert, in Zentrifugenröhrchen (Nunc) überführt und 5 min, bei 900 Upm abzentrifugiert (Heraeus). Das Zellpellet wird in eiskaltem FCS mit 8% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen (je 1 ml) aliquotiert. Die Röhrchen werden langsam auf –80°C herunter gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen werden die Zellen in Kryoröhrchen im 37°C-Wasserbad erwärmt, in vorgewärmtes Zellkulturmedium, das sich in einem Zentrifugenröhrchen (Nunc) befindet, bei 5 min bei 900 Upm zentrifugiert, das Zell-Sediment wird in Zellkulturmedium resuspendiert und auf Gewebekultur-Petrischalen (Nunc oder Corning) ausgesät.

Für Hybridomzellen werden am Tag zuvor primäre Maus Makrophagen ausgesät, die als Feederzellen für die Hybridome benötigt werden.

2.4.2 Zellbiologische Techniken

2.4.2.1 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion wird mit FuGENE 6 (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Für adhärente Zellen in einer 35 mm Kulturschale (= 3x 15 mm runde Deckgläser) wird 6 µl FuGENE 6 mit 100 µl Serum freiem Medium vermischt, 5 min RT. Diese Mischung wird zu 2 µg DNA langsam mit leicht vermengenden Bewegungen hinzupipettiert und 15 min bei RT stehengelassen. Diese Suspension, in der sich DNA-Lipid-Komplexe gebildet haben, wird auf die Zellen pipettiert, vermischt und für 12-24 Stunden inkubiert.

Für eine stabile Transfektion werden die Zellen auf einer 6 cm oder 10 cm Gewebeschale transfiziert. Die Transfektionsreagenzien werden entsprechend angepaßt. Nach 12-24 Stunden werden die Zellen auf zehn 10 cm Gewebeschalen umgesetzt und das Selektionsmittel G418 (Gibco) wird zum Medium gegeben. Für PtK2-Zellen wird mit einer Konzentration von 800 µg/ml, für B16F1 Zellen wird mit einer Konzentration von 1500 µg/ml G418 aggressiv selektiert, nach ca. 10 Tagen haben sich Einzelklone gebildet, die dann auf 2 „well“-Gewebekulturschalen um gesetzt werden und immer weiter verbreitert werden, bis sie eine Zelldichte zur Kryokonservierung besitzen. Der erhaltene Selektionsdruck wird bei PtK2-Zellen mit 400 µg/ml, bei B16F1-Zellen mit 1000 µg/ml aufrechterhalten.

2.4.2.2 Mikroinjektion von Proteinen in eukaryontische Zellen

Die Technik der Mikroinjektion wird mit einem automatischen Eppendorff-System (Micromanipulator 5171/Transjektor 5246) durchgeführt. Der Nadelhalter ist an ein Axiovert 135 TV Mikroskop (Carl Zeiss) angebracht. Von den aufgereinigten Protein- und Antikörperlösungen, die eine Konzentrationen von 0,2–4 mg/ml besitzen, werden ca. 2 µl in die Femtotips II (Eppendorff) mit Microloader (Eppendorff) pipettiert. Kurz vor der Beladung der Nadeln werden die Proteinlösungen in der gewünschten Konzentration durch sterile 0,2 µm x-spin Filtereinheiten von Costar bei 4°C 13000g (Eppendorff) 20 min zentrifugiert, um Aggregate und Staubpartikel abzutrennen.

PtK2-Zellen wurden mit einem 40x Ölobjektiv betrachtet und mikroinjiziert, anschließend zwei Stunden in den Inkubator zur Regeneration zurückgestellt, um nachfolgend mit *Listeria*

monocytogenes infiziert zu werden (siehe 2.4.2.3).

PtK2-Zellen werden nach einer Stunde Infektion mit *Listeria monocytogenes* mikroinjiziert und nach Abschluß der Infektion fixiert und in der Immunfluoreszenzfärbung analysiert oder unmittelbar nach der Injektion über digitale Videomikroskopie der Effekt der Mikroinjektion festgehalten.

2.4.2.3 Infektion von eukaryontischen Zellen mit *Listeria monocytogenes*

Die zu infizierenden Zellen werden grundsätzlich ohne Antibiotikazusatz im Medium kultiviert. Von einer über Nachtkultur (=stationäre Phase) von *Listeria monocytogenes* wird 1 ml entnommen, bei 6000 Upm 3 min sedimentiert (Zentrifuge 5415C, Eppendorff) und in 1 ml Zellkulturmedium bzw. Sulfatidsuspension aufgenommen. Auf Grund unterschiedlicher, oberflächenpräsender Glykoproteine der Zellen werden anfangs zwei unterschiedliche Infektionsprotokolle verfolgt, die zu einer erhöhten Infektionsrate von *Listeria monocytogenes* führen sollen.

Infektion von HeLa Zellen

Sulfatid (10 mg, Sigma) wird in 2 ml Chloroform/Methanol (2:1) gelöst und in einem Pyrex-Röhrchen bei -80°C aufbewahrt. Für einen Invasionsversuch wird 10 µl (50 µg) in ein Pyrex-Röhrchen pipettiert, unter N₂-Gas verdampft und in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und für 3x 5 min in einem Ultraschallbad in einem mit Eis gefüllten Behälter beschallt. Diese Sulfatidsuspension wird zu dem gewaschenen Bakterienpellet gegeben und 1h bei 37°C unter rotierenden Bewegungen inkubiert.

Infektion von PtK2 Zellen

Die Bakterien werden in einer Verdünnung von 1:500-1:1000 nach zweimaligem Waschen mit warmem Zellmedium eingesetzt.

Die Bakterien werden für 5 min mit 1900 Upm (Hereaus) RT in den gewünschten Verdünnungen auf die Zellen aufzentrifugiert, anschließend 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wird das Medium abgesogen, die Zellen werden zweimal mit warmem 25 µg/ml haltigem Gentamycin Medium, um extrazelluläre Bakterien abzutöten, gewaschen und mit Gentamycin Medium wieder mindestens zwei Stunden inkubiert, bevor die Zellen fixiert werden.

2.4.3 Generierung von Antikörpern

2.4.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Immunisierung der Mäuse

Die Methode der Generierung monoklonaler Antikörper wird nach Niebuhr et al. 1998 durchgeführt. Hierzu werden 4-10 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse (Harlan-Winkelmann) verwendet.

Pro Fusion wird drei Mäusen parallel das Antigen subkutan nach einem bestimmten Immunisierungsschema in die Hinterläufe gespritzt. Insgesamt erfolgen sechs Immunisierungen, bei denen ca. 100 µl Antigen/Maus (ca. 5-10 µg Antigen/Maus) injiziert werden. Für die erste Immunisierung wird das Antigen in kompletten Freudsche Adjuvans (CFA, Sigma) emulgiert, die zweite Injektion erfolgte nach vier Tagen in inkompletten Adjuvans (IFA, Sigma), die weiteren Immunisierungen folgen an den Tagen 8, 11, 14, 17. Am anschließenden Tag werden die sich an den Kniegelenken befindenden (poplitealen) Lymphknoten isoliert und die Zellfusion wird durchgeführt.

Isolierung von Peritonealmakrophagen

Die Mäuse werden durch Begasung mit CO₂ oder durch Genickbruch getötet. Das Fell über der Bauchdecke wird angeschnitten und abgezogen. Mit einer feinen Nadel (0,45mm) wird 4ml eiskaltes Medium (OPTIMEM) in die Bauchhöhle injiziert und vorsichtig massiert. Die Bauchdecke wird wieder mit einer feinen Nadel angestochen und das Medium mit den Makrophagen aus der Bauchhöhle abgezogen. Die Makrophagen einer Maus werden entweder in ein Kryoröhrchen eingefroren oder auf 5 Platten mit mehreren „wells“ bzw. auf 10 Zellkultur-Petrischalen (100mm) verteilt und als „Feeder“-Zellen für Hybridomzellen verwendet. Für eine Zellfusion werden die Makrophagen 3 Tage vorher in Selektionsmedium (s.u.) in 24-„well“-Platten ausplattiert.

Zellfusion (nach Peters & Baumgarten, 1990)

Alle benötigten Medien und Lösungen werden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

Polyethylenglycol-Lösung (PEG):

5 g PEG 4000 (Merck) werden bei 60°C (Wasserbad) in 5 ml DMEM mit 25 mM HEPES gelöst, der pH wird mit NaOH auf 7,4 eingestellt, die Lösung durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert und zu je 1 ml aliquotiert.

Hypoxanthin-Azaserin-Selektionsmedium (HA):

Zu OPTIMEM-Medium (mit Zusätzen siehe oben) wird 20 mg/ml Hypoxanthin und 1,5 mg/l Azaserin (Sigma) zugesetzt.

Die Antikörper produzierenden primären Maus B-Lymphozyten werden mit der murinen Myelomzelllinie Ag8 fusioniert, um eine „unsterbliche“ Antikörper produzierende Chimerezelllinie zu erhalten. Nicht fusionierte Ag8-Zellen sterben auf Grund eines Enzymdefektes in ihrem Hauptsyntheseweg der Purinbasen, der für die Synthese von Nukleinsäuren bereitgestellt werden muß, ab, nur fusionierte Zellen überleben. Normale Zellen verfügen über einen Reserveweg und können durch Zugabe von Hypoxanthin überleben. Die Myelomzellen können dagegen diesen Reserveweg nicht nutzen, da sie nicht über das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase verfügen, so daß sie nach wenigen Tagen absterben. Durch das Screenen der sekretierten Maus-Antikörper und das anschließende Subklonieren, um monoklonale Antikörper zu erhalten, werden Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften isoliert und es wird eine Kartierung des Epitopes mit Hilfe von immobilisierten Peptiden gemacht.

Vorbereitung der Ag8-Myelomzellen

Die Ag8 Myelomzellen werden expandiert, so daß sie sich zum Zeitpunkt der Zellfusion in einer logarithmischen Wachstumsphase mit einer Zellzahl von ca. 4×10^8 Zellen befinden. Zur Zellfusion werden die Suspensionzellen resuspendiert, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei 950 Upm (Hettich, Rotanta/AP) pelletiert, mit DMEM mit 25 mM HEPES (ohne weitere Zusätze) gewaschen, nochmals abzentrifugiert und in DMEM mit 25 mM HEPES aufgenommen.

Isolierung der poplitealen Lymphknoten

Die B-Lymphozyten haltigen, poplitealen Lymphknoten, die sich bei den Mäuse direkt unter dem Kniegelenk befinden, werden mit einer feinen Schere und Pinzette aus den umgebenden Sehnen heraus präpariert. Nach zweimaligem Waschen in OPTIMEM werden die isolierten und von weiterem Gewebe befreiten Lymphknoten in DMEM mit 25 mM HEPES (ohne Zusätze) überführt. Eine Zellsuspension wird hergestellt, indem die Lymphknoten grob zerschnitten und anschließend zwischen den aufgerauten („frosted“) Enden von Objektträgern gerieben werden. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml- Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und bei 950 Upm (Hettich, Rotanta /AP) abzentrifugiert.

Auf das Lymphozytenpellet werden die Ag8-Myelomzellen gegeben, vermengt und 5 min bei 950 Upm abzentrifugiert. Das Medium wird bis auf einen geringen Teil verworfen, das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert und auf 37°C gebracht. Da die konstante Temperatur von 37°C bei der Zellfusion eine wichtige Rolle spielt, wird bei den nachfolgenden Schritten der Boden des Röhrchens in das Wasserbad gehalten. Innerhalb einer Minute wird tropfenweise 1 ml PEG (Polyethylenglycol 4000) 4000 auf das Zellpellet gegeben, dabei wird das Röhrchen leicht geschüttelt. Nach einer weiteren Minute wird das PEG langsam durch Zugabe von DMEM mit 25 mM HEPES verdünnt: 1 ml 30 s, 3 ml in 30 s und schließlich 16 ml innerhalb einer Minute. Anschließend werden die Zellen 5 min bei 37°C inkubiert, dann abzentrifugiert, in HA-Selektionsmedium aufgenommen und auf den vorbereiteten 24 „well“-Platten mit Makrophagen ausplattiert.

Nach 3-4 Tagen werden die Hybridomzellen durch Zugabe von frischem Medium versorgt, und nachdem sich nach 8-10 Tagen deutlich sichtbare Klone entwickelt haben, werden die Überstände auf spezifische Antikörper untersucht. Die Zellen, deren Überstände in den Tests eine positive Reaktion zeigten, werden auf 6 „well“-Platten expandiert und bei geeigneter Zelldichte zu je 4 Kryoröhrchen pro „Hybridomzellklone“ eingefroren. Der zusätzlich gewonnene Überstand kann zu weiteren spezifischeren Tests zugezogen werden.

Subklonierung

Durch das Austesten der Überstände, die während der Fusion entstanden sind, kann nicht gewährleistet werden, daß es sich um definitionsgemäß monoklonale Antikörper (mAk) handelt. Dazu wird die Hybridomzellendichte mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Von der Zellsuspension wird eine Verdünnungsreihe von 50, 10, 2,5, 0,5, 0,25 Zellen / „well“ hergestellt, die in 96-„well“-Gewebekulturplatten (Nunc) pipettiert werden. Das Wachstum der Zellen wird durch das Mikroskop überprüft und die Anzahl der wachsenden Klone genauestens bestimmt. Nach etwa 10-14 Tagen werden die Überstände, die von einem einzigen Klon produziert werden, abgenommen und auf den Gehalt an spezifischen Antikörper getestet. Bei positivem Resultat werden die Klone expandiert, eingefroren und der Kulturüberstand wird für weitere Tests z.B. Subklassentest aufbewahrt. Zur Sicherheit werden die Einzelklone in der Regel ein zweites Mal subkloniert.

Monoklonale Antikörper Produktion

Um größere Mengen an Überstand zu gewinnen, wird der Hybridomzellenklon bei einer Zelldichte von ca. 10^8 Zellen in eine 2 Literflasche (Schott) umgesetzt. Anfangs wird die

Rollerkultur mit 200 ml Medium in einem Inkubator (37°C, 8% CO₂) auf einer Rollerkulturanlage (Heraus) inkubiert. Nach ca. 7 Tagen wird das Medium auf 400 ml aufgefüllt und die Hybridomzellen werden eine weitere Woche inkubiert. Die Hybridomzellen werden durch Zentrifugation (950 Upm, 10 min, anschließend 5000g, 30 min) abgetrennt. Der Überstand wird mit Natriumazit gegen Bakterien versetzt und ist für immunchemische Nachweismethoden verwendbar.

2.4.3.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Antigene werden auf eine Konzentration von ca. 100 µg/ml konzentriert und aliquotiert, die Firma Eurogentec (Belgien) führte die Immunisierung und Blutung der Kaninchen nach einem von ihr standardisierten Protokoll durch.

2.4.4 Immunchemische Nachweismethoden

2.4.4.1 ELISA-Enzyme Linked Immunsorbent Assay

Verwendete Lösung:

Entwicklerlösung:	6,25 ml	0,1 M Citrat-Puffer
	6,25 ml	0,2 M Na ₂ HPO ₄
	12,5 ml	H ₂ O
	10 mg	o-Phenylendiamin
	12,5 µl	H ₂ O ₂

Für den ELISA werden „Maxisorp“-Microtiterplatten (Nunc) verwendet; grundsätzlich werden Doppelbestimmungen und Positiv- wie Negativkontrollen durchgeführt. Das Antigen (50-100 µl/well) wird in 0,1 M Carbonatpuffer (NaHCO₃) pH 9,6 auf eine geeignete Konzentration gelöst bzw. verdünnt (über Nacht bei 4°C). Das Blockieren erfolgt mit 10% FCS/PBS für 1 Stunde 37°C, die Platte wird mit PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper (Hybridomüberstand oder bei gereinigten Antikörpern in 10%FCS/PBS) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird mit dem Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Wahl des Sekundärantikörpers richtet sich nach dem Erstantikörper, bei einem Maus- oder einem Kaninchen- spezifischen wird ein Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova) genutzt. Vor der Entwicklung des ELISA wird nochmals sehr gut mit PBS gewaschen, um freie Peroxidase-Antikörper zu entfernen. Die Färbelösung mit H₂O₂ und o-Phenylendiamin als Substrat muß jeweils frisch angesetzt werden. Pro „well“ werden 200 µl Entwicklungsreagenz zugegeben und die

Färbereaktion wird durch Zupipettieren von 50 µl/„well“ H₂SO₄ abgestoppt. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der OD₄₉₀ (Referenz OD₅₆₀) mit einem „Microplate Reader“ (BIORAD, Modell 3550).

2.4.4.2 Subklassentest

Die Immunglobulinsubklassen der einzelnen monoklonalen Antikörper werden durch das Prinzip des ELISA bestimmt. Bei dem Antigen handelt es sich um einen Ziege-anti-Maus IgG & IgM Antikörper (Dianova), der mit einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet wird. Als Sekundärantikörper werden spezifisch erkennende Antikörper gegen IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM (Medac) und als Positivkontrolle wird ein Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova) aufgetragen und entwickelt. Durch die spezifische Reaktion der Zweitantikörper kann ermittelt werden, daß eine Subklasse von Antikörpern existiert und welche es ist, was bei weiteren Analysen wichtig ist (z.B. Aufreinigung oder Immunpräzipitation).

2.4.4.3 Western Blot

Verwendete Puffer und Lösungen:

Blotpuffer:	Tris-Base	50 mM
	Glyzin	39 mM
	SDS	1,3 mM
	Methanol	20% (v/v)

Transfer auf Trägermembran

Zum Transfer der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Trägermembran (Poly-Vinylidene-Di-Fluorid, Immobilon P, Millipore) wird ein "semi-dry"-Verfahren angewendet. Die Gele werden nach dem Lauf kurz in Blotpuffer äquilibriert, ebenso wie die Immobilon-Membran, die vorher durch Methanol aktiviert wird. Danach werden auf die mit Blotpuffer befeuchtete Anoden-Graphitplatte/2 Lagen Filterpapier (Whatman, in Blotpuffer getränkt)/Immobilon-P-Membran/SDS-Gel/2 Lagen Filterpapier luftblasenfrei geschichtet.

Die Transferzeit beträgt 1 bis 2 Stunden bei 6-8 V/cm Membran

2.4.4.4 Immunfärbung und Chemolumineszenz

Verwendete Puffer und Lösungen:

TBS-T:	Tris-HCl, pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween 20	0,1% (v/v)

Zum Absättigen der Immobilon-Membran, damit alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden, wird diese über Nacht bei 4°C mit 10% FCS in TBS-T inkubiert.

Anschließend werden je nach Ursprung des verwendeten Antikörpers monoklonale Antikörper als unverdünnter Hybridom-Kulturüberstand oder affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper in 10% FCS/TBS-T mit der Membran inkubiert (1 Stunde, RT). Der peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wird bis zu einer Verdünnung von bis zu 2000fach in 10% FCS in TBS-T eingesetzt. Die Inkubationszeit beträgt jeweils 1h bei RT auf einem Schwenktisch. Nach jedem Inkubationsschritt wird die Membran für je 10 min mit

1. TBS-T
2. TBS-T + 0,5 M NaCl
3. TBS-T + 0,5% (v/v) Triton-X-100

gewaschen.

Chemolumineszenz

Die Chemolumineszenz stellt ein hochsensitives Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen dar. Sie basiert darauf, daß die Peroxidase, die an die Sekundärantikörper gekoppelt ist, in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol oxidiert. Dabei wird Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichtet.

Das ECL-Substrat (Enhanced-Chemo-Luminescence, Amersham-Buchler) wird den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die gewaschene Membran wird für ca. 1 min bei RT mit der proteintragenden Seite nach oben mit ECL-Substrat benetzt. Anschließend läßt man das Substrat vorsichtig auf Filterpapier ablaufen und legt die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Overhead-Projektor Folien. Auf der so eingeschlagenen Membran wird für wenige Sekunden bis zu 15 Minute, je nach Reaktionsstärke, ein Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak) durch Auflegen exponiert. Dieser wird in einer automatischen Entwicklungsmaschine (Agfa Curix 50) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

Chlornaphtolfärbung

Das Entwicklungssubstrat, das wesentlich unempfindlicher ist als der Nachweis der Chemolumineszenz, wird jeweils frisch aus den Komponenten hergestellt, da es instabil ist:

25 ml PBS
1,5 ml 0,3 % (w/v) 4-Chlornaphtol in Methanol
20 µl 30% H₂O₂

Die Reaktion wird durch Spülen mit Wasser gestoppt und ist bei 4°C in H₂O oder als getrocknete Membran einige Tage lagerbar.

2.4.4.5 Anfärbung der PVDF Membrane

Amidoschwarz-Färbung

Färbelösung: 0,1% Amidoschwarz
25% Isopropanol
10% Essigsäure; filtriert

Entfärber: 25% Isopropanol
10% Essigsäure

Trotz Blockierung der Membran mit 10% FCS kann diese nach Abschluß des Western Blotes mit Coomassie oder Amidoschwarz, einer schnelleren und empfindlicheren Färbemethode, irreversibel angefärbt werden. Proteinbanden werden sichtbar und die Zuordnung von Protein zu Western Blot Ergebnissen wird deutlich. Die Membran wird für 10 min in der Färbelösung geschwenkt, anschließend in Entfärber je nach Proteingehalt entfärbt.

2.4.5 Immunologische Methoden

2.4.5.1 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein-G

Es werden ca. 200 ml Hybridomüberstand (siehe 2.4.3.1) über eine Protein-G Säule (Sigma) gegeben, anschließend sorgfältig mit PBS gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgt mit 0,1 M Glyzin, pH 3, das Eluat wird in ca. 1 ml Fraktionen gesammelt, das mit 100 µl 1 M Tris-Cl, pH 8,8 neutralisiert wird. Die Antikörperkonzentration der einzelnen Fraktionen wird durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD₂₈₀) gegen Glyzin-Puffer mit Tris-Cl ermittelt. Fraktionen mit einer OD₂₈₀ über 0,1 werden vereinigt, gegen PBS umgepuffert und aufkonzentriert. Dies erfolgt mit Hilfe von Centriprep-10-Röhrchen (Amicon/Millipore) durch Zentrifugation (Sorvall T6000, 3000 Upm).

2.4.5.2 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Benötigte Puffer:

Vorelutionspuffer: 0,1 M Na-Acetat
0,5 M NaCl, pH 4,8

Elutionspuffer: 0,2 M Na-Acetat
0,5 M NaCl, pH 2,5

Vor Nutzung der Protein-CNBr-gekoppelten Sepharose wird die Säule mit der Elutionslösung gewaschen, um assoziierte, aber nicht gebundene Proteine auszuwaschen. 10-20 ml des vorgetesteten Kaninchenserums wird im „Batch“-verfahren mit der Sepharose für 1 Stunde bei RT rotierend inkubiert. Das Serum wird aufgefangen, um je nach verbliebener Antikörperkonzentration nochmals affinitätsgereinigt zu werden. Die Säule wird mit 100 ml PBS gewaschen. Die Eluate (20 ml Vorelutionspuffer, anschließend ca. 20 ml Elutionspuffer), Fraktionen von ca. 1 ml, werden durch Vorlage von 100 µl 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Elutionspuffern besitzen die eluierten Antikörper unterschiedliche Affinitäten. Für die weitere Aufreinigung wird das Umpuffern und Aufkonzentrieren wie bei monoklonalen Antikörpern gehandhabt.

2.4.5.3 Lineare Epitopcharakterisierung von Antikörpern (Niebuhr and Wehland 1997)

Zu verwendeten Lösungen:

Lösung A: 8 M Harnstoff
1% SDS
0,5% β-Merkaptoethanol

Lösung B: 50% EtOH
10% Essigsäure

Die lineare Epitopcharakterisierung von Antikörpern wird auf Peptidscans, die von der Arbeitsgruppe von Dr. R. Frank (Frank et al. 1992) in Braunschweig an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mit einem ABIMED-Gerät (AMS Multiple Peptid Synthesizer, Modell 22 sample Changer, Dilutor 401) hergestellt wurde, durchgeführt.

Die gewünschte Aminosäuresequenz des Proteins wird in je 15 Aminosäuren auf eine Membran gespottet, die sich in 3 oder 1 Aminosäure nicht überlappt. Diese Membran wird wie ein Western Blot behandelt. Positive Spots werden durch den Vergleich zu der Proteinsequenz analysiert. Die Peptidscans sind wieder verwendbar, vor bzw. nach Gebrauch wird der Peptidscan auf Hintergrund, durch die Inkubation und Entwicklung des Sekundären Antikörpers, überprüft. Zur

Wiederverwendung des Peptidscans wird dieser in H₂O gewaschen, mit Lösung A dreimal je 10 min schwenkend inkubiert, abgelöst durch die Inkubation von Lösung B ebenfalls dreimal je 10 min schwenkend. Der Peptidscan wird dann in 100% EtOH gewaschen und getrocknet, bei –20°C gelagert. Vor Benutzung wird mit 10% FCS abgesättigt und der Hintergrund bestimmt.

Bezeichnung / Protein	Überlappungen der Spots
ActA gesamt Protein	6 AS
ActA (AS104-200)	14 AS
ActA (AS1-104)	14 AS
m prp48 (1-297)	12 AS
EGFP C1-C3	12 AS

Tabelle 2: Darstellung der verwendete Peptidscans

2.4.5.4 Immunpräzipitation

Verwendete Puffer:

Solubilisierungs Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5
 150 mM NaCl
 1% NP 40
 Proteaseinhibitoren

Waschpuffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 150 mM NaCl
 0,2% NP 40
 2 mM EDTA

Waschpuffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 500 mM NaCl
 0,2% NP 40
 2 mM EDTA

Waschpuffer C: 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Für die Herstellung des Zellextraktes werden 2 ml Solubilisierungs Puffer pro dicht gewachsener 10 cm Gewebekulturschale, nach zweimaligem Waschen mit PBS, für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend wird das Zellysate abgekratzt und die Zelltrümmer werden für 30 min bei 4°C mit 13000g abzentrifugiert. Der Zellextrakt wird aliquotiert und bei –80°C konserviert.

2,4 µg affinitätsgereinigtes, polyklonales Serum wird an 100 µl ProteinA gekoppelt oder ca.100 µg monoklonaler Antikörper wird an ProteinG gekoppelt (2h bei RT leicht „über Kopf“ rotierend). Anschließend wird die Sepharose mit PBS gewaschen und mit 100-200 µl Zellextrakt über Nacht bei 4°C ebenfalls leicht „über Kopf“ rotierend inkubiert. Die Suspension wird mit drei Volumen Waschlösung A, anschließend mit zwei Volumen Waschlösung B und einmal mit

Waschlösung C gewaschen. Die Protein G-Sepharose wird entweder mit Glyzin-Puffer ca. 50 µl inkubiert und der Überstand mit SDS-Probenpuffer und 3 µl 1 M Tris-Lösung versetzt, oder direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt und für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.4.5.5 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Gerichtet gegen das Protein	Lineares Epitop	Herkunft
α 24A6 p21-Arc	p21-Arc		GBF- Braunschweig
α VASP IE 273D4	VASP		GBF- Braunschweig
α Vinculin	Vinculin		Sigma
α Zyxin 184 C1	Zyxin		GBF- Braunschweig
α Paxillin	Paxillin		Molecular probes
α Mena B49C12	Mena		GBF- Braunschweig
α 358C1	ActA	⁸⁴ TNKADLIA ₉₁	GBF- Braunschweig
α 191E7	ActA	⁸⁶ KADLIAM ₉₂	GBF- Braunschweig
α 349 D4	ActA	⁹² MLKEKAE ₉₇	GBF- Braunschweig
α 195H1	ActA	SRNAGFD	GBF- Braunschweig
α 87 C9	ActA 10 /10a Peptid	nicht nachweisbar	diese Arbeit
α 282 E1	ActA 10 /10a Peptid	DSELESLTYPD	diese Arbeit
α 250 F4	ActA 10 /10a Peptid	SAAEIKKR	diese Arbeit
α GFP 101G4	GFP	QQNTPI	diese Arbeit
α GFP 270F3	GFP	QQNTPI	diese Arbeit
αGFP27F5	GFP	DHYQQN	diese Arbeit

Tabelle 3a: Zusammenstellung der verwendeten monoklonale Antikörper:

Bezeichnung	Gerichtet gegen das Peptid / Protein	Herkunft
α p21-Arc	p21-Arc	GBF- Braunschweig
α 119ActA	Peptid 119	diese Arbeit
α GFP	GFP	diese Arbeit
α GST 174	GST	GBF- Braunschweig

Tabelle 3b: Zusammenstellung der verwendeten polyklonale Antikörper:

Bezeichnung	Gekoppelt mit	Firma
Ziege anti Maus IgG & IgM (H+L)	Peroxidase	Dianova
Ziege anti Kaninchen IgG & IgM (H+L)	Peroxidase	Dianova
Ziege anti Maus IgG & IgM (H+L)	Alexa 488	MoBiTec
Ziege anti Maus IgG & IgM (H+L)	Alexa 594	MoBiTec
Ziege anti Kaninchen IgG & IgM (H+L)	Alexa 488	MoBiTec
Ziege anti Kaninchen IgG & IgM (H+L)	Alexa 594	MoBiTec

Tabelle 3c: Zusammenstellung der verwendeten gekoppelten Sekundärer Antikörper:

Bezeichnung	bindet an	Firma
Texas Red-konjugiertes Phalloidin	F-Aktin	Sigma
Cy 3-konjugiertes Phalloidin	F-Aktin	Sigma
Fluorescent Desoxyribonuclease I- fluorescein conjugated	G-Aktin	Molecular Probes

Tabelle 3d: Zusammenstellung der an Fluorochrom konjugierten Substrate**2.4.6 Biochemische Methoden****2.4.6.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) (nach Laemmli, 1970)**

Lösungen:

Acrylamidstammlösung: Acrylamid 30% (w/v)
N,N-Methylenbisacrylamid 0,8% (w/v)

Hierfür wird die fertige Lösung Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe) verwendet.

4x SDS-Probenpuffer:	4 ml	10 % (w/v) SDS-Lösung
	0,6 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	2,3 ml	H ₂ O
	4 ml	Glyzerin
	0,4 ml	2β-Mercaptoethanol
	0,2 ml	5% (w/v) Bromphenolblau

Trenngel	7,5%	10,0%	15,0%		
	3,0	2,44	1,44	ml	H ₂ O
	1,5	1,52	1,52	ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	1,5	2	3	ml	Acrylamidstammlösung
	60	60	60	μl	10% (w/v) SDS-Lösung
	8	8	8	μl	TEMED

Die Polymerisation wird mit 12 μl 25% (w/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS) ausgelöst.

Sammelgel (5%):	1,8 ml	H ₂ O
	320 μl	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	330 μl	Acrylamidlösung
	25 μl	10% (w/v) SDS-Lösung
	6 μl	TEMED

Die Polymerisation wird mit 10 μl 25% (w/v) APS ausgelöst.

Für Proteinelektrophorese werden Minigelapparaturen (Biometra) der Größe 8,5x7,0 cm mit 1 mm Stärke verwendet. Die Gele werden zum Polymerisieren vor dem Elektrophorese mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur behalten, besser über Nacht bis zu 2 Wochen bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Laufpuffer:	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glyzin
	0,1% (w/v)	SDS

Proteinmarker:

Als Molekulargewichtsstandart diente ein 10kDa-Marker (Gibco) oder ein bereits vorgefärbter Kaleidoskopmarker und Prestainmarker (Biorad), sie werden mit 7 µl/Gel eingesetzt.

Durchführung der Gelelektrophorese

Alle Proben werden kurz vor dem Auftragen für mindestens 5 min auf 95°C erhitzt.

Pro Gel wird die Spannung zunächst auf 120 V, der Strom auf max. 15 mA zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel gehalten, anschließend auf 160 V, max. 20 mA hoch geschaltet, die Laufstrecke richtet sich je nach der Proteingröße und Auftrennung des Gels. Die Gele werden entweder zur Western Blot Analyse verwendet oder einer Proteinfärbung wie z.B. Silber- oder Coomassie-Färbung unterzogen (siehe 2.4.6.2-2.4.6.3). Die Gel werden dann anschließend in einer Geltrockner-Apparatur (Biotech Fischer) getrocknet.

2.4.6.2 Coomassie-Färbung

Verwendete Puffer und Lösungen:

Coomassie-Färbelösung:

0,25% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)
45% (v/v)	Isopropanol
9% (v/v)	Essigsäure
46% (v/v)	H ₂ O

Coomassie-Entfärber:	10% (v/v)	Essigsäure
	40% (v/v)	Methanol
	50% (v/v)	H ₂ O

Zur Anfärbung von Proteinbanden wird das SDS-Gel mindestens 1 Stunde, meist über Nacht, in der Färbelösung auf einem Schwenktisch bei RT inkubiert. Anschließend wird es entfärbt, bis die Banden deutlich kontrastiert zu erkennen sind. Das Gel kann auf einer Geltrockner-Apparatur getrocknet und dokumentiert werden.

2.4.6.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wird mit einem "Silver Stain Plus Kit" (Biorad) in gründlich gereinigten Glasschalen nach Angaben des Herstellers durchgeführt, für die Verdünnungen der Reagenzien wird nur deionisiertes Wasser verwendet. Die Reaktion wird abgestoppt, indem das Gel in 5% (v/v) Essigsäure überführt wird, bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Anschließend wird das Gel getrocknet und dokumentiert.

2.4.6.4 Expression und Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wird das jeweilige Genkonstrukt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektor pGEX-6P1 der Firma Pharmacia kloniert. Dieser Vektor bietet die Möglichkeit, das gewünschte Polypeptid in Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase von *E. coli* exprimieren zu lassen. Der Vorteil besteht in einer einfachen Aufschluß- und Reinigungsmethode. Glutathion-S-Transferase bindet sehr stark an sein Substrat Glutathion. Das Fusionsprotein läßt sich somit spezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix binden und anschließend mit freiem Glutathion eluieren, die Expression des Fusionsproteins aus dem Vektor pGEX-6P1 bietet außerdem die Möglichkeit, das gewünschte Protein von GST durch Spaltung mit der PreScissionTM Protease (Pharmacia) hoch effizient abzutrennen.

Verwendete Puffer und Lösungen

IPTG-Lösung:	100 mM	Isopropyl- D- galactopyranosid, sterilfiltriert.
Elutionspuffer:	20 mM	reduziertes Glutathion (Sigma), pH 9,0 in TBS
Cleavage Buffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,0 (bei 25°C)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	Dithiothreitol

Die Konstrukte werden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und eine 10 ml Vorkultur aus LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wird angesetzt. Diese wird zum Animpfen in eine Hauptkultur gegeben und bis zu einer OD₆₀₀=0,8 bei 37°C angezogen. Die weiteren Schritte wurden für jedes Konstrukt durch Vorversuche herausgefunden:

Konstrukte	IPTG konz.	Temperatur während der Induktion	Induktionszeit	Gewünschte Vorlage des Proteins
GST	0,1 mM	37°C	über Nacht	Elution mit Glutathion
Mena EVH1	0,1 mM	20°C	über Nacht	Elution mit Glutathion

Tabelle 4: Zusammenfassung der Expression und Reinigung verwendeter GST-Proteine

Die Kultur wird 10 min bei 8000 Upm abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF) resuspendiert. Die Bakterien werden mit Hilfe einer French Press (Modell FA-078-E1/SLM Instruments Corp.) aufgeschlossen und das Lysat wird mindestens 30 min bei 12000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird zu 1,33 ml immobilisierter Glutathion Agarose (Pierce) gegeben, die vorher 5 mal mit dem 10-fachen Volumen an PBS gewaschen wird. Der Ansatz wird mindestens 30 min im Überkopf-Schüttler bei 4°C und rotierend inkubiert. Alle ungebundenen Proteine und Extraktreste werden durch sechsmaliges Waschen mit dem 10-fachen Volumen an PBS entfernt. Vor jedem Auftrennungs- und Aufreinigungsschritt wird eine Probe für eine SDS-Page gezogen, um die Expression des Proteins zu kontrollieren.

Elution des GST-Fusionsprotein

Die Matrix wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorff) überführt und der Überstand restlos entfernt. Zur Elution werden 850 µl Elutionspuffer zugegeben, 15 min im Überkopf-Schüttler geschwenkt, kurz abzentrifugiert (500xg/5 min) und der Überstand als Eluat abgenommen. So werden ca. 10 Fraktionen gewonnen und auf einem SDS-Gel kontrolliert. Die Protein haltigen Fraktionen werden gepoolt und gegen PBS dialysiert.

Spaltung des GST-Fusionsprotein

Die Matrix wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in den Cleavage Buffer eluiert und mit 40 µl (80Units) der PreScissionTM Protease bei 4°C über Nacht leicht „über Kopf“ rotierend inkubiert. Das Eluat wird nochmals über ca. 1 ml immobilisierter Glutathion Agarose gegeben und für 1h bei RT leicht rotierend inkubiert. Das daraus gewonnene Eluat wird gegen PBS dialysiert, der Proteingehalt gemessen und aliquotiert bei -80°C weggefroren.

2.4.6.5 Kopplungsmethoden von Peptiden und Protein an Trägermaterialien

Kopplung von Peptiden an Ovalbumin und keyhole limpet hemocyanin (KLH)

Die Synthese und Abtrennung der Schutzgruppe von den Peptiden wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. W. Tegge durchgeführt.

Den Peptiden wird am N-Terminus eine Cysteingruppe angefügt, die den Peptiden als reaktive Gruppe dient. Diese Gruppe ist durch eine tertiäre Butylgruppe geschützt, die für die Kopplung abgespalten werden muß. Diese wird durch die über Nacht-Inkubation von 500 mM DTT in PBS oder in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer abgetrennt. Dieser Ansatz wird über eine präparative C18-Säule (VYDAC) mit einer HPLC-Anlage aufgetrennt (Merk/Hitachi L6200A, UV-Detektor L4000). Die Elution der entschützten Peptide erfolgt in der Regel bei 20-40% (v/v) Acetonitril. Die Fraktionen, bei denen der UV-Detektor eine erhöhte OD₂₁₃ gemessen hat, werden gepoolt, lyophilisiert, bei -70°C eingefroren.

Die Kopplung an Ovalbumin und KLH wird nach dem Protokoll von der Firma PIERCE „Inject Maleimide Activated Carrier Proteins“ durchgeführt.

Kopplung an CNBr-Sephrose 4B (Pharmacia)

Benötigter Puffer:

Boratpuffer: 0,1 M Borsäure
 0,5 M NaCl mit NaOH auf pH 8,4

2 g Sepharose wird auf einer Glasfritte (Porengröße 2, Schott) erst mit 400 ml 2 mM HCl und anschließend mit 500 ml Boratpuffer gewaschen. Das Protein wird über Nacht gegen Boratpuffer dialysiert. Säulenmaterial und Protein werden zusammen 4 Stunden bei RT rotierend inkubiert, die Säule wird mit dem dreifachen Säulenvolumen mit 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 gewaschen und anschließend 1 Stunde RT mit 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 rotierend inkubiert. Die Säule wird anschließend mit einem Säulenvolumen mit PBS gewaschen.

2.4.6.6 Benutzte Peptide

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
ActA-39	C ₋₇₉ NKVRNTNKADLIAMLEKAEKGPNINNNNSE ₁₀₉
ActA-10	C ₋₁₄₁ SAAEIKRRKAIASSDS ₁₅₇
ActA-10a	C ₋₁₄₂ AAEIKRRKAIASSDSELES ₁₇₁ TPDKPTKV ₁₇₁

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten synthetischen Peptide

2.4.7 Indirekte Immunfluoreszenz und Digitale Videomikroskopie

2.4.7.1 Säuberung der Deckgläser

Bevor die Zellen auf die Deckgläser ausplattiert werden, werden diese zunächst ausgiebig mit demineralisiertem H₂O, anschließend mit 40% EtOH/60% HCl (30 min) und wieder ausgiebig

mit demineralisiertem H₂O gewaschen, so daß die Deckgläser fett- und staubfrei vorliegen. Vor Plattierung der Zellen werden die Deckgläschen für 30 min unter UV-Licht sterilisiert.

2.4.7.2 Beschichtung von Deckgläsern

Für die Mikroinjektionsversuche von Antikörpern in PtK2 und HeLa Zellen werden die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin 20 µg/ml (Sigma) vorbehandelt.

B16F1 Zellen bilden auf unterschiedlichen Substraten vermehrt z.B. „focal contact“ auf der Plattierung von Fibronectin aus oder Lamellipodien durch die Stimulierung durch Laminin, was sich auch auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen auswirkt. Für die Observierung der B16F1 Zellen werden die Deckgläschen mit Laminin in 150 mM NaCl/50 mM Tris mit einer Konzentration von 20 µg/ml beschichtet, nachfolgend kurz mit 150 mM NaCl/50 mM Tris gespült. Für die Injektionsversuche der B16F1 Zellen werden die Deckgläschen mit 25 µg/ml Fibronectin (Boehringer Mannheim) in 2M Harnstoff beschichtet und anschließend ausgiebig mit PBS gewaschen.

2.4.7.3 Indirekte Immunfärbung

Lösungen:

Fixierlösungen:

-3,7% Paraformaldehyd (PFA) in PBS, pH 7,5

-25% Glutaraldehyd (GA) Lösung für Elektronenmikroskopie wird in CB-Puffer verdünnt

Cytoskeleton-Buffer (CB) pH 6,1:	10 mM	MES (Sigma)
	150 mM	NaCl
	5 mM	EGTA
	5 mM	MgCl ₂
	5 mM	Glucose; pH mit NaOH einstellen

Adhärenente Zellen werden mit der Durchführung des Experimentes angepaßter Dichte auf Glasdeckgläschen ausgesät, je nach Experiment am Tage darauf transfiziert oder fixiert, mit PBS gewaschen.

Fixierungen

Paraformaldehydfixierung: 3,7% (w/v) Paraformaldehyd/0,1% Triton in PBS für 20 min bei RT fixiert und gleichzeitig permeabilisiert.

Glutaraldehydfixierung: 0,5% GA/0,25% Triton x 100 in CB pH 6,1 1 min nachfolgend 1% GA in CB für 10 min. Damit freie Amid-Gruppen reagieren und der „Hintergrund“ gedrückt wird, wird anschließend 30 min mit 200 mM Glycerin oder 1,5 mM Tris pH 8,8 inkubiert.

Nachdem die Fixierlösung abgezogen wurde, werden die Deckgläschen mit PBS gewaschen. Nachfolgend werden die fixierten Zellen mit 1% BSA in PBS blockiert und nochmals kurz in PBS gewaschen. Für die Immunfluoreszenz-Reaktion wird auf die Innenseiten eines Parafilmstückes die Antikörperlösung pipettiert, Hybridomüberstände werden unverdünnt eingesetzt, aufgereinigte Antikörper werden in 1% BSA ihrer Konzentration entsprechend verdünnt (10-20 µl). Das Deckgläschen wird mit der Zellseite nach unten auf die Antikörpertropfen gelegt. Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde bei RT, gewaschen wird standardmäßig dreimal mit PBS. Dazu gibt man 200 µl PBS an den Rand des Deckgläschens auf den Parafilm, damit sich die Flüssigkeit unter das Glasplättchen zieht und dieses aufschwimmt, so daß die Zellen beim Aufheben der Deckgläschen nicht abgerissen werden. Jedes Deckgläschen wird nacheinander in drei Bechergläsern (100 ml) mit PBS vorsichtig eingetaucht. Die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper erfolgt analog dazu.

Im Anschluß werden die Deckgläschen auf einem Objektträger in einem Tropfen Prolong Antifade (Molecular Probes) eingebettet und für mindestens 1 Stunde bei 37°C oder bei 4°C über Nacht getrocknet. So können sie bei 4°C vor Licht geschützt ca. 3-4 Wochen gelagert werden.

2.4.8 Digitale Fluoreszenzmikroskopie

2.4.8.1 Videomikroskopiemedien

Um den richtigen pH-Wert außerhalb des Inkubators für die Zellen zu gewährleisten, werden HEPES-gepufferte Medien verwendet.

Für PtK2 und HeLa-Zellen ist dies L15-Leibovitz (Gibco), für B16F1 Zellen ist dies F12-Ham Nutrient mixture (Sigma), zu diesen Medien werden auch die unter (2.4.1.1) genannten Zusätze hinzugefügt. Die Ausnahme ist Pen/Strep bei Infektionen mit Listerien.

2.4.8.2 Videomikroskopiezubehör

Mikroskopausstattung

An das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) ist ein variabel einstellbarer 100 W Quecksilberhochdruckdampfampe (Atto Arc, Carl Zeiss) und Chroma-High Q Filter für die fluoreszierenden Farbsubstrate Fluoresceinisothiocyanat (FITC/Sigma) und GFP sowie Keio Filter für Carbocyanin3 (Cy3/Molecular Probes) und Rhodamin (Molecular Probes) angebracht. Durch die elektrisch aktivierten Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D 122 Shutter Driver,

Vistron Systems) kann die Beleuchtung für Phasenkontrast und Epifluoreszenz manuell oder automatisch von IPLab Spektrum Software (Princeton Instruments Inc. Trenton, USA) kontrolliert werden. Eine Gesamtvergrößerung läßt sich durch Optovar-Linsen um die Faktoren 1,6 oder 2,5 erhöhen.

Objektive

Verwendet werden folgende Plan-Neofluar- und Plan-Apochromat-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss)

Optovarvergrößerung		x1	x1,6	x2,5
Objektiv	NA	µm/Pixel		
100x Plan-Apo	1,40	0,148	0,093	0,060
63x Plan-Apo	1,40	0,138	0,080	0,051

Tabelle 6: Darstellung der Objektivvergrößerungen

Für jede Objektiv-Optovar-Kombination ist die Dimension der projizierten Fläche pro CCD-Pixel aufgeführt, mit der Distanzen berechnet werden können. Das Immersionöl (Zeiss) hat einen Brechungsindex von 1,518.

Kammersystem zur Lebendbeobachtung von Zellen und angeschlossene Heizsysteme

Für Injektionsversuche werden die Zellen auf 15 mm runde Deckgläser ausplattiert, diese werden dann in eine Serie 20 Chamber Platform (WARNER Instrument CORP., Model PH4) eingespannt. Nach Injektion wird diese dann mit einem 18x18 Deckglas abgedeckt, um die Verdunstung und Temperaturschwankungen des Mediums einzuschränken.

Für reine Lebendbeobachtungen der Zellen und intrazellulären Listerien wird eine Recording/Perfusions Chamber (WARNER Instrument CORP., Model RC-25F) benutzt.

Zur Kontrolle der Temperatur bei Langzeitbeobachtungen werden die Kammersysteme an die zugehörigen Kontrolleinheiten (Focht Live-Cell Chamber System (FCS2), Bioptechs) angeschlossen. Temperatursensoren sorgen für das konstante Einhalten der optimalen Temperatur. Um Wärmeverlust durch die Immersionsölobjektive zu verhindern, werden auch die Objektive beheizt (Bioptechs).

Cooled-Charged-Coupled-Divice (CCD)- Kamerasystem

Das CCD-Kamerasystem (Princeton Instruments Inc., Modell TE/CCD-1000 TKB) mit elektronisch aktiviertem Verschluß und Kontrolleinheit wird von der IPLab Spektrum Software (Princeton Instruments Inc. Trenton, USA) unterstützt. Diese Einheit wird auf -20°C gekühlt.

Für die Mikroinjektionsversuche mit Aufnahmen über das Videogerät wird eine Hamamatsu

CCD Kamera C3077 verwendet.

2.4.8.3 Software für Bildverarbeitung und Videoanalyse

Scion Image 1.62 (Princeton Instruments Inc. Trenton, USA)

IPLab (Princeton Instruments Inc. Trenton, USA)

Adobe Photoshop 5,0-8,0 (Adobe Systems, Edinburgh, UK)

Adobe Illustrator 7,0-8,0 (Adobe Systems, Edinburgh, UK)

2.4.8.4 Indirekte Immunfluoreszenz nach Videomikroskopie

Observierte Zellen werden mit Glutharaldehydfixierung für einen F-Aktin Nachweis in der Videomikroskopie-Kammer mit Cy3-gekoppeltem Phalloidin vorbereitet. Hierzu wird anschließend mit einer 1:500 Verdünnung in 1% BSA das Präparat 15 min inkubiert und nachfolgend mit 1% BSA ausgiebig gewaschen. Das Präparat wird mit einer 0,5 mM DTT Lösung überschichtet und ausgewertet.

3. Ergebnisse

Modellsysteme für die Analyse von zellulären Prozessen auf der Ebene von Protein-Protein Interaktionen stellen eine wichtige Methode dar, um komplexe Prozesse zu vereinfachen und zu verstehen. In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Modellsysteme genutzt, um die Aktinfilamentdynamik besser untersuchen und analysieren zu können.

Bei dem ersten Modellsystem handelt es sich um die intrazelluläre Motilität von *Listeria monocytogenes*, die auf dem listeriellen Oberflächenprotein ActA beruht. ActA vereinigt die erforderlichen und effektorisch wirksamen Domänen, die ebenfalls von Wirtszellproteinen für die Rekrutierung von Proteinen zur Aktinfilamentbildung benötigt werden.

Als weiteres Modellsystem wurden GFP-Fusionsproteine eingesetzt, die es ermöglichen *in vivo* die Lokalisation und die Dynamik von ausgewählten Proteinen mit der Videomikroskopie zu verfolgen. Damit kann eine Beteiligung dieser Proteine an der Aktinfilamentbildung untersucht werden. Für die detailliertere Charakterisierung der exprimierten GFP-Fusionsproteine wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen GFP hergestellt.

3.1 Funktionsuntersuchungen des N-terminalen Bereiches von ActA und Identifizierung von eukaryonten ActA analogen Proteinen unter Verwendung von ActA spezifischen Antikörpern

ActA ist nicht nur einer der Hauptvirulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*, sondern auch das essentielle Protein, welches die aktinvermittelte, unidirektionale Bewegung der Listerien im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle und somit deren Ausbreitung von Zelle zu Zelle ermöglicht (Domann et al. 1992, Kocks et al. 1992). Für den N-Terminus von ActA konnten durch unterschiedliche Deletionsmutanten mittels „Mitochondrien-Targeting“ den Domänen spezifische Funktionen zugeordnet und in einem Aminosäuremotiv von AS 128-152 eingegrenzt werden. Dieses Aminosäuremotiv ist für die Rekrutierung des Aktins an die Listerien verantwortlich (Pistor et al. 1995). Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß das Motiv der Aminosäuren 146-150 von ActA hinsichtlich der Aktinfilamentbildung dominiert. Eine Punktmutation innerhalb dieses Motivs inhibiert die Aktinfilamentrekrutierung und somit die intrazelluläre Bewegung der Listerien (Pistor et al. 2000). Zusätzlich zu diesem Bereich sollen auch die Aminosäuren 62-92 aktinfilamentbindende Eigenschaften besitzen (Lasa et al. 1997, Pistor et al. 2000).

Zelluläre Faktoren, wie der für die Aktinnukleation und -polymerisation notwendige Arp2/3-

Komplex, sind durch ihre Rekrutierung an den N-Terminus von ActA für die Aktinfilamentbildung essentiell (Welch et al. 1998). Bisher konnte keine direkte Bindung zwischen ActA und dem Arp2/3-Komplex nachgewiesen werden. Es finden sich aufgrund von Proteinsequenzvergleichen Hinweise darauf, daß es zu dem N-Terminus von ActA Wirtszell homologe Proteine gibt, wie z.B. die WASP-Familie, die an die Untereinheit p21-Arc binden. Durch diese Sequenzvergleiche konnte eine Bindungsstelle des Arp2/3-Komplexes an ActA postuliert werden (Machesky et al. 1998, May et al. 1999).

Um die funktionellen Bereiche des N-Terminus von ActA im Hinblick auf die aktinvermittelte Bewegung analysieren zu können, wurden ActA Antikörper verwendet, die diesen Bereich erkennen.

Antikörper werden hauptsächlich in immunchemischen Nachweismethoden verwendet. Insbesondere werden monoklonale Antikörper eingesetzt, da sie nur mit einem einzigen Epitop reagieren. Darüber hinaus können Antikörper für funktionelle Studien genutzt werden, z.B. wenn das Epitop innerhalb funktioneller Domänen des Antigens liegt und der Antikörper die Aktivität des Antigens beeinflußt (Lamb et al. 1997, Kovary 1995).

Daher sollte in dieser Arbeit durch Mikroinjektion der ActA Antikörper in die mit *Listeria monocytogenes* infizierten Zellen versucht werden, die Interaktion zwischen ActA und bekannten/unbekannten Zytoskelettproteinen zu stören und die daraus resultierenden Effekte auf die intrazelluläre Bewegung zu untersuchen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden von K. Niebuhr einige spezifische monoklonale ActA Antikörper (195H1, 358C1, 191E7 und 349D4) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (unveröffentlicht). Die Antikörper 358C1, 191E7 und der Antikörper 349D4 erkennen lineare Epitope, die in der von Lasa et al. (1997) postulierten ActA Bindungsregion mit Aktin liegen. Abbildung 6 veranschaulicht die in dieser Arbeit generierten und eingesetzten ActA Antikörper.

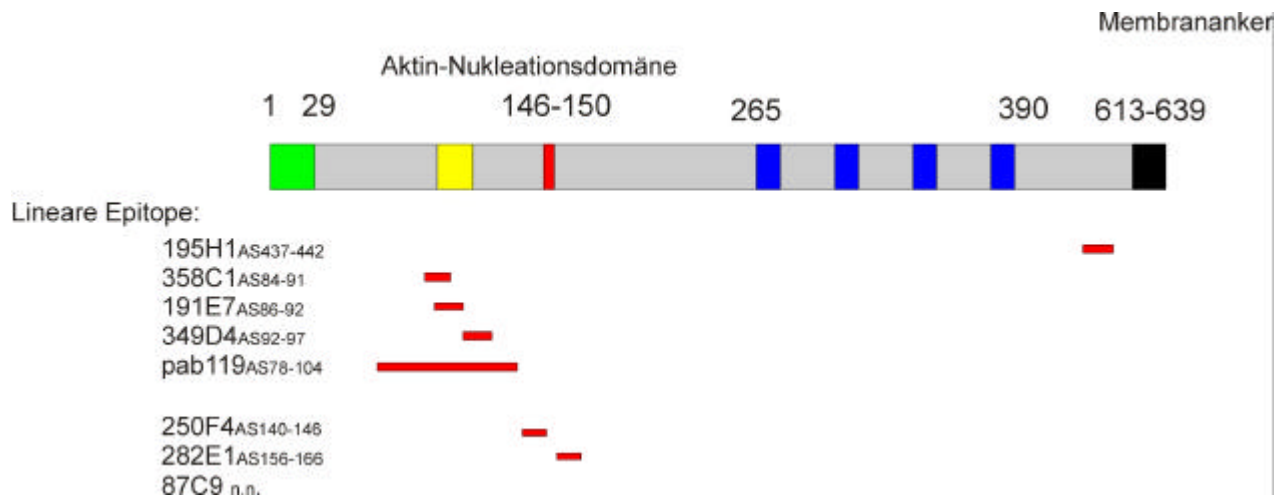


Abbildung 6: Zusammenfassung der verwendeten ActA Antikörper, die für die funktionelle Untersuchung des N-Terminus von ActA in dieser Arbeit eingesetzt wurden; n.n.: nicht nachweisbar

3.1.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Peptidantikörper gegen die Aminosäuren 79-109 von ActA

Es wurden polyklonale Antikörper gegen ein synthetisches Peptid, das den Aminosäurebereich 79-109 von ActA umfaßt, hergestellt. Somit sollte eine Inhibierung der Interaktion zwischen zellulären Proteinen und ActA leichter erkannt werden. Das synthetische Peptid ActA 39 mit den ActA Aminosäuren 79-109 wurde an Ovalbumin gekoppelt. Nach Charakterisierung des Antiserums wurde eine Affinitätsreinigung mit dem Peptid ActA 39 durchgeführt. Die gereinigten Antikörper reagierten sowohl positiv mit gereinigtem ActA im ELISA und im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz auf Paraformaldehyd fixierten, listerienhaltigen Präparaten (nicht gezeigt). Zur Analyse der Bindungsmöglichkeit der affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper an lineare Strukturen wurden diese mit einem Peptidscan inkubiert (siehe 2.4.5.3 und Abbildung 7). Die Antikörper reagieren mit Peptiden, die bei Aminosäure 78 beginnen und bis Aminosäure 109 reichen, was genau der Sequenz des zur Immunisierung verwendeten Peptids entspricht.

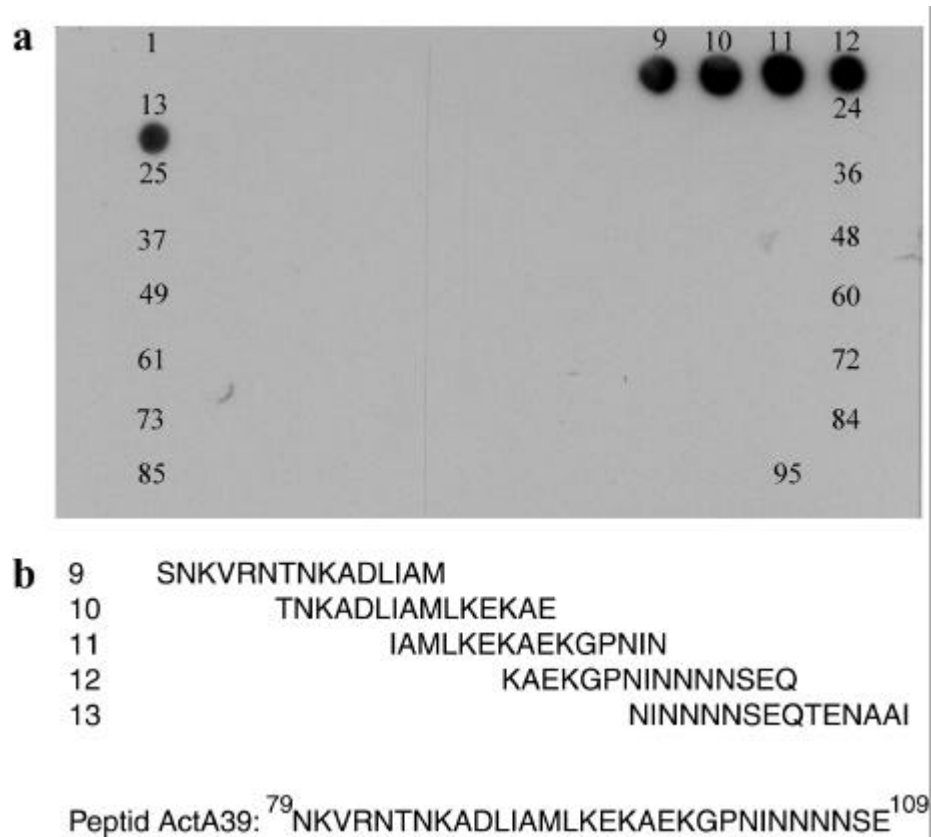


Abbildung 7: Reaktion der affinitätsgereinigten, polyklonalen Peptidantikörpern mit dem Aminosäurebereich 79-109 von ActA.

a) Die Peptide von ActA AS 30-590 wurde mit je 15 Aminosäuren pro Spot auf einen Filter synthetisiert. Dieser Peptidscreen mit 9 Aminosäuren überlappenden Sequenzen wurde mit den affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörpern 119 inkubiert.

b) Zeigt die Aminosäuresequenzen der positiven Spots und das für die Immunisierung und für die Aufreinigung benutzte synthetische Peptid ActA 39

3.1.2 Herstellung spezifischer monoklonaler Peptidantikörper gegen den Aminosäurebereich 141-171 von ActA

Es wurden monoklonale Peptidantikörper gegen ActA hergestellt, da bei früheren Immunisierungen und Fusionen gegen das gesamte Protein ActA keine monoklonalen Antikörper gegen diesen ActA Bereich (Aminosäuren 141-171) generiert werden konnten (persönliche Mitteilung K. Niebuhr). Der Bereich mit der Aminosäuresequenz 146-150 wird für die Aktinnukleation verantwortlich gemacht. Diese Sequenz entspricht der analogen Domäne von SCAR1 und WASP. Um die Wahrscheinlichkeit der Antikörperproduktion für die Aktinnukleationsdomäne zu erhöhen, wurden zwei unterschiedlich lange Peptide für die Fusion verwendet. Zum einen handelt es sich um das Peptid ActA10, zum anderen um das Peptid ActA10a (siehe Tabelle 5). Die Peptide wurden an KLH gekoppelt und nach dem

Immunisierungsschema (siehe 2.4.3.1) in je 3 BALB/c-Mäuse injiziert. Nach der Selektion wurden die Überstände der Antikörper sekretierenden Hybridome im ELISA auf gereinigtem ActA (50ng/well) und ungekoppeltem Peptid ActA10a (5 µg/ml) mit dem Ziel getestet, Antikörper zu identifizieren, die das native ActA Protein erkennen. Daher wurden die Hybridomklone ausgewählt, deren Antikörper im ELISA auf gereinigtem, nativem ActA und darüber hinaus mit dem Peptid ActA 10a mit einer Extinktion OD₄₉₀ größer als 0,2 reagierten. Die positiven Klone wurden im Western Blot mit gereinigtem ActA (50 µg/Gel) und in der Immunfluoreszenz auf infizierten Zellen mit dem *Listeria monocytogenes* EGD Wildtyp (wt) getestet (nicht gezeigt). Während im Western Blot keiner der ausgewählten Klone eine positive Reaktion zeigte, waren in der Immunfluoreszenz einige Klone positiv.

Die Klone 87, 250 und 282 wurden aufgrund der erhöhten Extinktionswerte im ELISA ausgewählt, da das primäre Entscheidungskriterium die Erkennung von nativem ActA ist. Anschließend wurden sie subkloniert und die Subklasse und das lineare Epitop durch Peptidspotanalyse charakterisiert (siehe Tabelle 7).

Im ELISA konnte ebenfalls eine Kreuzreaktion mit Domänen des eukaryonten Proteins SCAR1 (Bear et al. 1998) gefunden werden. Um den Bindungsbereich der ActA Peptidantikörper genauer lokalisieren zu können, wurden unterschiedliche Fragmente des Proteins SCAR1 im ELISA eingesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, daß der Antikörper 87 mit der WH2-Domäne von SCAR1 kreuzreagiert, während der Antikörper 282E1 die saure Domäne von SCAR1 (AS 532-559) erkennt, die als die analoge Sequenz von ActA (AS 143-175) identifiziert wurde (Machesky et al. 1998, May et al. 1999).

Antikörper Bezeichnung	ELISA auf [OD ₄₉₀]		Immunfluoreszenz	Subklasse	Lineares Epitop	ELISA auf SCAR1 - [OD ₄₉₀]		
	Peptid ActA10a [5µg/well]	ActA [50ng/well]	Infizierte Zellen			Fl [0,56ng/ml]	WA [2ng/ml]	W [2ng/ml]
87	0,643	0,385	+	IgG1		0,256	0,426	0,746
87C9	n.d.	n.d.	n.d.	IgG1	n.n.	n.d.	n.d	n.d
250	0,21	n.d.	+	IgG1/IgG2b		0,275	0,454	0,425
250F4	0,223	n.d.	n.d.	IgG2b	SAAEIKKR	0,183	0,188	0,167
282	1,445	0,788	+	IgG1/IgG2a		0,331	0,555	0,92
282E1	n.d.	n.d.	n.d.	IgG1	DSELESLTPD	0,4	0,714	0,198

Tabelle 7: Zusammenfassung der Antikörpercharakterisierung für den ActA Bereich AS 141-171. Dargestellt sind monoklonale Antikörper, die natives ActA erkennen. Ebenfalls ist die Kreuzreaktion der ActA-Antikörper mit dem analogen Protein SCAR1 (Fl gesamt Protein) aufgezeigt. Die Bezeichnungen SCAR1-WA (AS 443-559) und SCAR1-W (AS 443-547) wurden von May et al. 1999 übernommen.

Die generierten Antikörper wurden gegen natives ActA selektiert, so daß eine Erkennung von ActA innerhalb von Zellen während einer *Listeria monocytogenes* Infektion sehr wahrscheinlich ist.

Im Folgenden sollen zwei Aspekte verfolgt werden, zum einen der Einfluß der Antikörper auf die listerielle, intrazelluläre Bewegung, zum anderen die Möglichkeit der Konkurrenz der Bindung von bekannten, zellulären Bindungspartnern.

3.1.3 Mikroinjektion von ActA-spezifischen Antikörpern in Epithelzellen vor der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Um Proteine in Zellen einzubringen, hat sich vor allem die Methode der Mikroinjektion als geeignet erwiesen. Insbesondere können mit dieser Methode bestimmte Prozesse auf der Ebene einzelner Zellen untersucht werden (Jockusch et al. 1986). In eine Zelle kann dabei bis zu 10% ihres Zytoplasmavolumens (ca. 10^{-8} bis 10^{-7} µl) injiziert werden (Wang et al. 1982). Die injizierte Proteinmenge wird im Wesentlichen durch die Mikroinjektionstechnik (Injektionsdruck und Injektionszeit) beeinflusst. Da die Antikörper innerhalb einer Zelle weitestgehend stabil sind, bleiben sie über Stunden aktiv. Die Injektion in die Epithelzellen erfolgte ca. 1-2 Stunden vor Beginn der Infektion mit *Listeria monocytogenes*, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, sich nach der Injektion zu regenerieren. Die aufgereinigten, monoklonalen Antikörper 195H1, 191E7, 349D4, 358C1 wurden mit Nadelkonzentrationen von 0,25 bis 2 mg/ml und der affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörper 119 wurde mit einer Konzentration von 0,5 und 2 mg/ml injiziert. Die monoklonalen Antikörper, die gegen den Bereich AS141-171 gerichtet sind (87C9, 250F4, 282E1), wurden mit einer Konzentration von 4 mg/ml injiziert.

Der monoklonale Antikörper 195H1 erkennt ein lineares Epitop im C-Terminus von ActA und dient als Kontrolle zur Erkennung unspezifischer Reaktionen, die Auswirkungen auf die Bewegung der Listerien haben könnten. Die Injektion von 2 mg/ml beeinflusste die Aktinfilamentbildung von *Listeria monocytogenes* nicht (nicht dargestellt).

Die monoklonalen Antikörper 191E7 und 358C1 erkennen mit Abstand von zwei Aminosäuren das gleiche Epitop. Sie zeigen in ihrer phänotypischen Wirkung die gleichen Effekte und werden daher im Folgenden zusammengefaßt dargestellt. Bei einer Injektion von 0,25 mg/ml der Antikörper 191E7/358C1 und 349D4 konnten motile intrazelluläre Listerien durch Immunfluoreszenz deutlich lokalisiert werden. Signifikante Effekte der injizierten Antikörper, die im weiteren detailliert beschrieben werden, konnten erst ab einer Konzentration von

0,5 mg/ml nachgewiesen werden.

Die mikroinjizierten Antikörper 191E7/358C1 führten zu einer Mikrokoloniebildung im Zytoplasma der Epithelzellen. Dieser Effekt wurde ab einer Mindestkonzentration 0,5 mg/ml gefunden. In Abhängigkeit von der Infektionsrate der Listerien und der Konzentration der Antikörperlösung bildeten sich eine oder mehrere Mikrokolonien innerhalb der injizierten Zellen. Dies galt entsprechend auch für höhere Antikörperkonzentrationen, die in die Zellen injiziert wurden.

Daraus läßt sich ableiten, daß die Motilität der in die Zelle eingedrungenen Listerien sofort inhibiert wird. Die Listerien verbleiben, nachdem sie aus dem Phagosom entkommen sind, in einer unbeweglichen Phase, wobei sie sich ständig teilen. Dadurch entstehen während der gesamten Zeit des Infektionsversuches durch die Bakterienvermehrung Mikrokolonien. Um den Einfluß der Antikörper an den ActA N-Terminus auf die Bindung von bekannten zellulären Proteinen zu untersuchen, wurden Gegenfärbungen mit Texas-Red konjugiertem Phalloidin (Abbildung 8a, a'), mit FITC konjugierter DNase I (Abbildung 8b, b') und mit affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörpern, die gegen die Untereinheit p21-Arc des Arp2/3-Komplexes gerichtet sind (von L. Gröbe zur Verfügung gestellt) (Abbildung 8c, c'), durchgeführt.

Die Injektion des Antikörpers 349D4, dessen Epitop an das des Antikörpers 191E7 anschließt, führte im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Ergebnis nicht zu einer Mikrokoloniebildung der intrazellulären Listerien. Dies ist durch die Verteilung der Listerien im Zytoplasma eindeutig nachweisbar. Durch die Darstellung der Aktinfilamente mit Texas-Red konjugiertem Phalloidin zeigte sich, daß die Bakterien kleine Ansätze von F-Aktin als Schweife aufwiesen (Abbildung 8d, d'). Im Gegensatz zu Listerien, die in nicht injizierten Zellen Aktinfilamentschweife aufwiesen, waren diese deutlich verkürzt. Die durch die Injektion des Antikörpers 349D4 verringerte F-Aktinfilamentbildung weist auf eine intrazelluläre Bewegung mit einer geringeren Geschwindigkeit hin. Eine Gegenfärbung mit FITC konjugierter DNase I (Abbildung 8e, e') und polyklonalen p21-Arc Antikörpern (Abbildung 8f, f') zeigte eine vergleichbare Verteilung der Proteine wie im Falle von F-Aktin und entspricht der in nicht injizierten Epithelzellen.

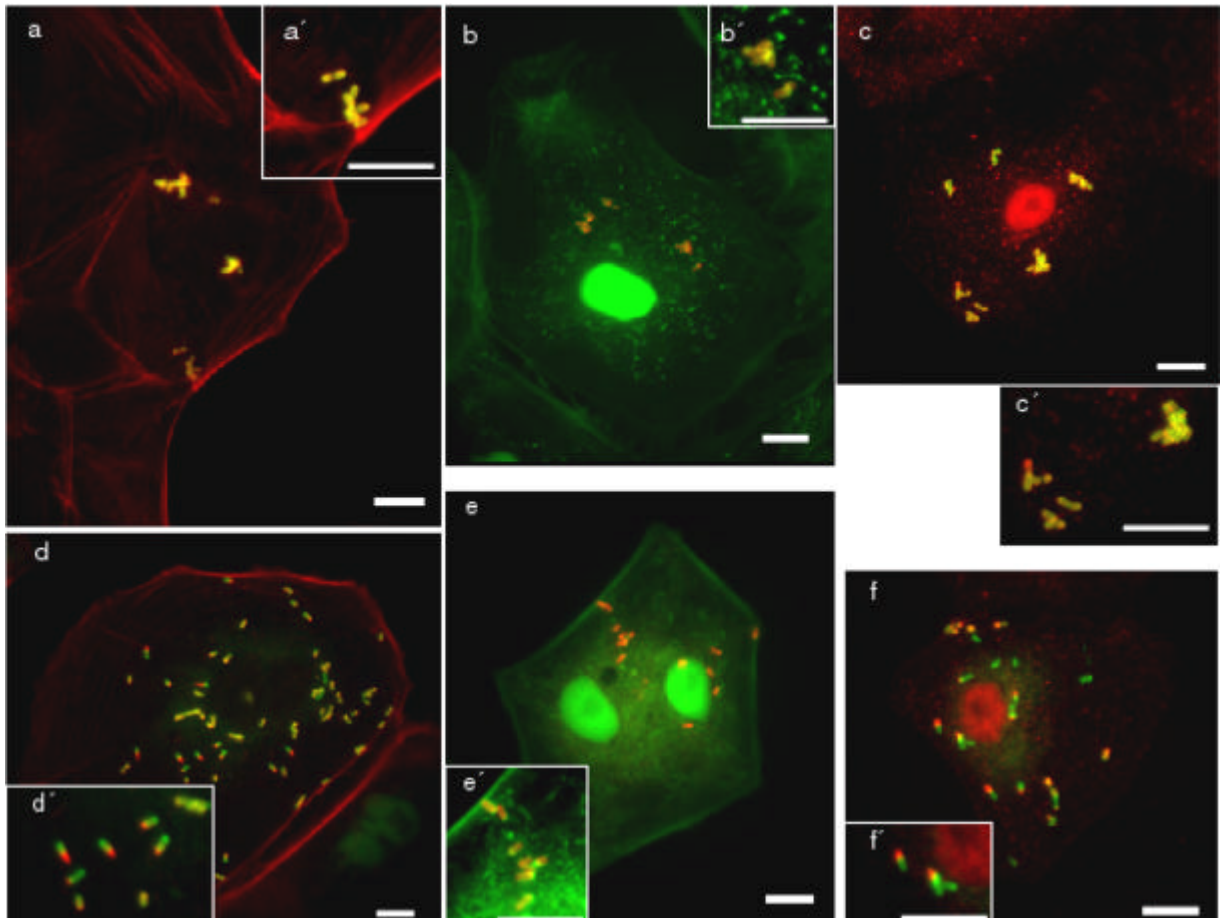


Abbildung 8: Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen von mikroinjizierten Epithelzellen nach Injektion der monoklonalen ActA Antikörper 191E7 und 349D4, die anschließend mit *Listeria monocytogenes* infiziert worden waren.

Die Abbildungen a-c zeigen die Effekte des mit einer Konzentration von 1 mg/ml injizierten ActA Antikörpers 191E7 in infizierte PtK2-Zellen F-Aktin a, a' (rot), G-Aktin b, b' (grün) und p21-Arc des Arp2/3-Komplexes c, c' (rot).

d-f zeigen die Effekte des mit einer Konzentration von 1 mg/ml mikroinjizierten ActA Antikörpers 349D4 in infizierte PtK2-Zellen mit F-Aktin d, d' (rot), G-Aktin e, e' (grün) und p21-Arc des Arp2/3-Komplexes f, f' (rot).

In a, a', c, c', d, d' und f, f' wurde der injizierte ActA Antikörper mit dem Alexa 488 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) nachgewiesen, in Abbildung b, b' und e, e' mit dem Alexa 594 gekoppelten Sekundärantikörper (rot). In Abbildung c, c' wurde der Nachweis für p21-Arc mit einem Alexa 594 gekoppelten Sekundärenantikörper durchgeführt. Für den Nachweis des F-Aktin wurde Texas-Red konjugiertes Phalloidin (rot), für G-Aktin wurde FITC konjugierte DNaseI (grün) verwendet. Balken entsprechen 10 µm.

Da sich die linearen Epitope der injizierten monoklonalen Antikörper auf wenige Aminosäuren beschränken, wurden die affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper 119, die gegen die Aminosäuresequenz 79-109 gerichtet sind, in die Epithelzellen mit den Konzentrationen 0,5 und 2 mg/ml injiziert. Die Inhibierung der Bindung von zellulären Proteinen sollte unter diesen Bedingungen vollständig sein, da eine längere ActA Aminosäuresequenz durch die Antikörper blockiert wird. Der ausgelöste Phänotyp der Listerien ergab die Bildung von Mikrokolonien.

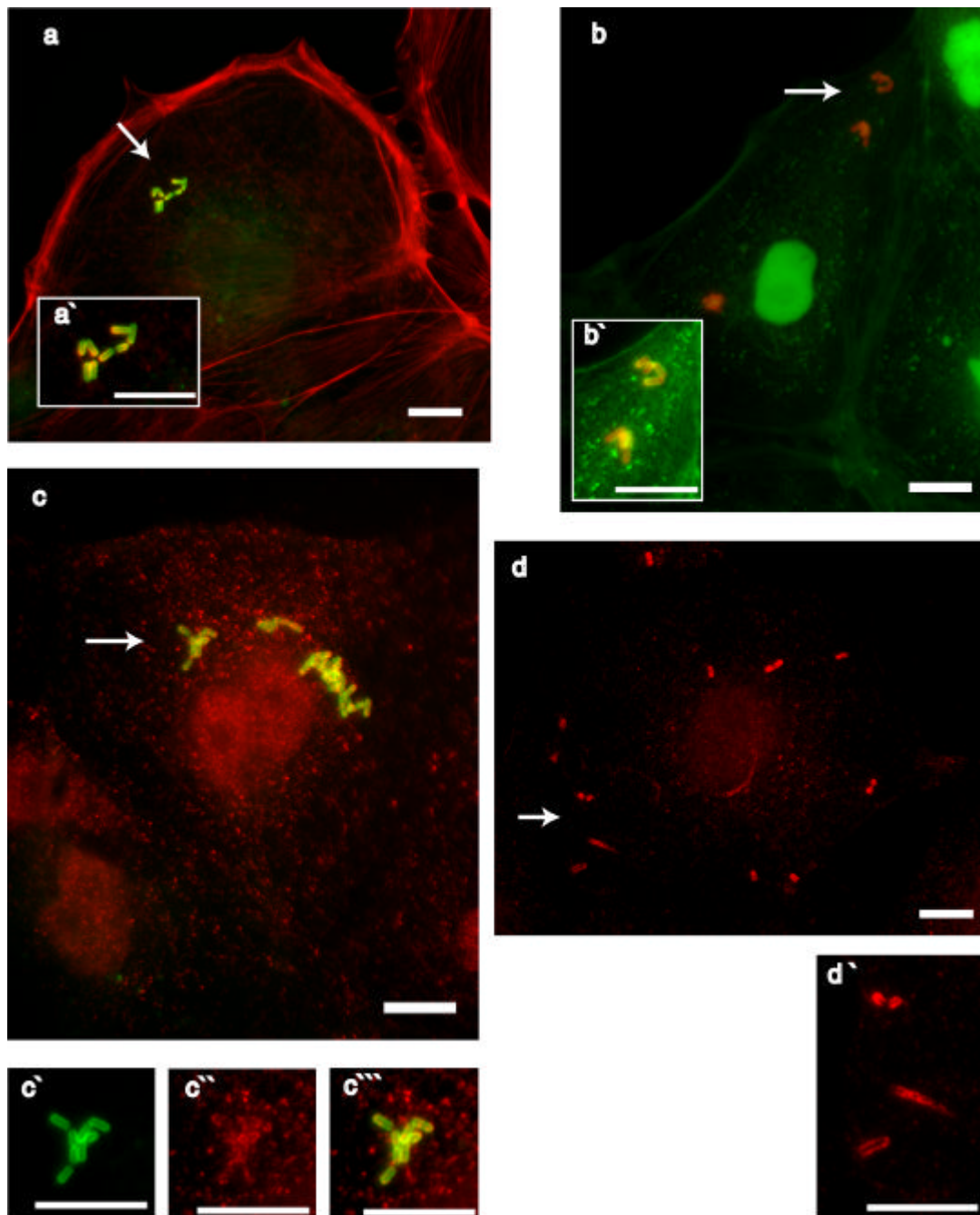


Abbildung 9: Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen von PtK2-Epithelzellen nach Mikroinjektion des affinitätsgereinigten, polyklonalen ActA Antikörpers 119 und anschließender Infektion mit *Listeria monocytogenes*.

Der polyklonale ActA Antikörper wurde vor der Infektion mit *Listeria monocytogenes* in PtK2-Zellen mit einer Konzentration von 2 mg/ml injiziert. Die Wirkung der Injektion auf das Verhalten der listeriellen, intrazellulären Bewegung ist in Abbildung a-c dargestellt. Abb. a, a' zeigt F-Aktin mit Texas-Red konjugiertem Phalloidin (rot), in b, b' ist mit FITC-DNase I Konjugat (grün) gegen gefärbt. Für Abbildung c und d wurden monoklonale Antikörper 24A6 gegen p21-Arc des Arp2/3 Komplexes verwendet. In Abbildung d ist eine nicht injizierte Zelle des gleichen Präparates wie Abb. c dargestellt als Kontrolle der Immunfärbung des 24A6 p21-Arc Antikörpers (nähere Erläuterung siehe Text).

In Abb. a und c wurden die injizierten Antikörper 119 mit dem Alexa 488 konjugierten Sekundärantikörper (grün), in Abb. b mit dem Alexa 594 konjugierten Sekundärantikörper (rot) dargestellt. Der monoklonale Antikörper p21-Arc in Abb. c und d wurde mit dem Alexa 594 konjugierten Sekundärantikörper dargestellt. Balken entsprechen 10 µm

Die Darstellung von Aktinfilamenten durch Texas-Red konjugiertes Phalloidin (Abbildung 9a, a') und FITC konjugierter DNase I (Abbildung 9b, b') zeigte keine Unterschiede in Bezug auf die Rekrutierung von Aktin der Listerien. Die Rekrutierung von F-Aktin und G-Aktin konnte eindeutig nachgewiesen werden. Bei einer Gegenfärbung mit dem monoklonalen p21-Arc Antikörper 24A6 (von L. Gröbe zur Verfügung gestellt) wurde jedoch keine eindeutige Färbung beobachtet (siehe Abbildung 9, in einer Vergrößerung und Einzelaufnahme c' bis c'''). Zur Kontrolldarstellung wurde eine nicht injizierte Zelle des selben Deckgläschens in der Abbildung d und d' aufgenommen. Wie in der Aufnahme c'' zu erkennen ist, kann das Protein p21-Arc kaum distinkt um die Listerienkolonie nachgewiesen werden. In der Abbildung d' ist jedoch deutlich sichtbar, daß der Antikörper die rekrutierte Untereinheit p21-Arc um die Listerien erkennt.

Die gegen den ActA Bereich AS 141-171 gerichteten, monoklonalen Antikörper 87C9, 250F4 und 282E1 wurden mit einer Nadelkonzentration von 4 mg/ml injiziert. Durch diese Injektion der Antikörper konnte über die Darstellung mit konjugiertem Phalloidin keine Beeinflussung auf das motile Verhalten von *Listeria monocytogenes* gezeigt werden. Die injizierten Antikörper erkannten allerdings Streßfasern der Zelle (nicht gezeigt).

Tabelle 8 stellt die durch die Mikroinjektion erzeugten Effekte der injizierten ActA Antikörper zusammenfassend dar. Die monoklonalen Antikörper 358C1 und 191E7 und der polyklonale Antikörper 119 zeigten ab einer injizierten Konzentration von 0,5 mg/ml die beschriebene Wirkung auf die intrazellulären Listerien, d.h. die Inhibierung der intrazellulären Bewegung. Der monoklonale Antikörper 349D4 ermöglicht zwar noch eine intrazelluläre Bewegung, aber es werden nur verkürzte Aktinfilamentschweife gebildet.

Antikörper	Epitop	Injektions- konzentration	Effekte auf intrazelluläre Listerien	Indirekte Immunfluoreszenz		
				F-Aktin	G-Aktin	p21-Arc
195H1	AS437-442	2 mg/ml	kein	+	+	n.d.
358C1	AS84-91	0,25-2 mg/ml	ab 0,5 mg/ml; Mikrokolonien	+	+	+
191E7	AS86-92	0,25-2 mg/ml	ab 0,5 mg/ml; Mikrokolonien	+	+	+
349D4	AS92-97	0,25-2 mg/ml	ab 0,5 mg/ml; verkürzte Aktin- filamentschweife	+	+	+
pab119	AS79-109	0,5 /2 mg/ml	ab 0,5 mg/ml; Mikrokolonien	+	+	+/-
250F4	AS140-146	4 mg/ml	kein	+	n.d.	n.d.
282E1	AS156-166	4 mg/ml	kein	+	n.d.	n.d.
89C9	n.n.	4 mg/ml	kein	+	n.d.	n.d.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Mikroinjektion von ActA Antikörpern in Epithelzellen, die anschließend mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden.

3.1.4 Mikroinjektion ActA-spezifischer Antikörper in Epithelzellen während der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die vorangegangenen Mikroinjektionsexperimente der Antikörper bezogen sich auf die Injektion vor der Infektion. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Antikörper unbekannte Wirtszellproteine beeinflussen und dadurch auf die listerielle, intrazelluläre Bewegung wirken. Um diesen potentiellen Effekt einzuschränken, wurde die Injektion an bereits infizierten Epithelzellen vorgenommen. Hierdurch sollte geklärt werden, ob die Antikörper 191E7, 358C1 und 349D4, die einen Effekt auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien zeigten, einen sofortigen Einfluß auf die listerielle Bewegung besitzen.

Die Antikörper wurden mit einer Nadelkonzentration von 1 mg/ml während der Infektion mit *Listeria monocytogenes*, d.h. 1 Stunde nach dem Start der Invasion, in ca. 30 minütigem Abstand in infizierte Zellen injiziert. Dadurch wurden intrazelluläre Listerien in unterschiedlichen Phasen der Infektion und der intrazellulären Bewegung erfaßt. Die Gegenfärbung in der indirekten Immunfluoreszenz erfolgte mit Texas-Red konjugiertem Phalloidin. Die injizierten Antikörper 191E7/358C1 und 349D4 zeigten, wie schon unter 3.1.4 beschrieben, unterschiedliche Auswirkungen auf die Motilität der Listerien. Bei der Mikroinjektion von 191E7/358C1 konnte beobachtet werden, daß nach jedem Zeitpunkt der Antikörperinjektion Mikrokolonien gebildet wurden. Die Kolonien waren durch die vorangegangene intrazelluläre Bewegung der Listerien innerhalb der Zelle stärker verteilt, zahlreicher und kleiner (nicht gezeigt).

Bei einer Injektion des Antikörpers 349D4 zeigte sich kein Einfluß des Mikroinjektionszeitpunktes im Verhältnis zu dem Infektionszeitpunkt, da keine Unterschiede der Phänotypen zu erkennen waren. Die Listerien besaßen in allen Untersuchungen ausschließlich verkürzte F-Aktinfilamentschweife (nicht gezeigt).

Um den genauen Zeitpunkt der Wirkung der injizierten Antikörper auf die Motilität der Listerien zu zeigen, wurden die Injektionen mit einer CCD-Kamera und einem Videogerät aufgezeichnet. Kontrollinjektionen mit PBS besaßen keinen Einfluß auf die Motilität der Listerien.

Durch die Videoaufnahmen konnte eindeutig gezeigt werden, daß die schon in der Immunfluoreszenz beobachteten Effekte der Antikörperinjektionen unmittelbar nach dem Eindringen ausgelöst werden. Die Injektion des Antikörpers 349D4 mit der Konzentration von 1 mg/ml zog eine sofortige Geschwindigkeitsabnahme der sich intrazellulär bewegenden Listerien nach sich.

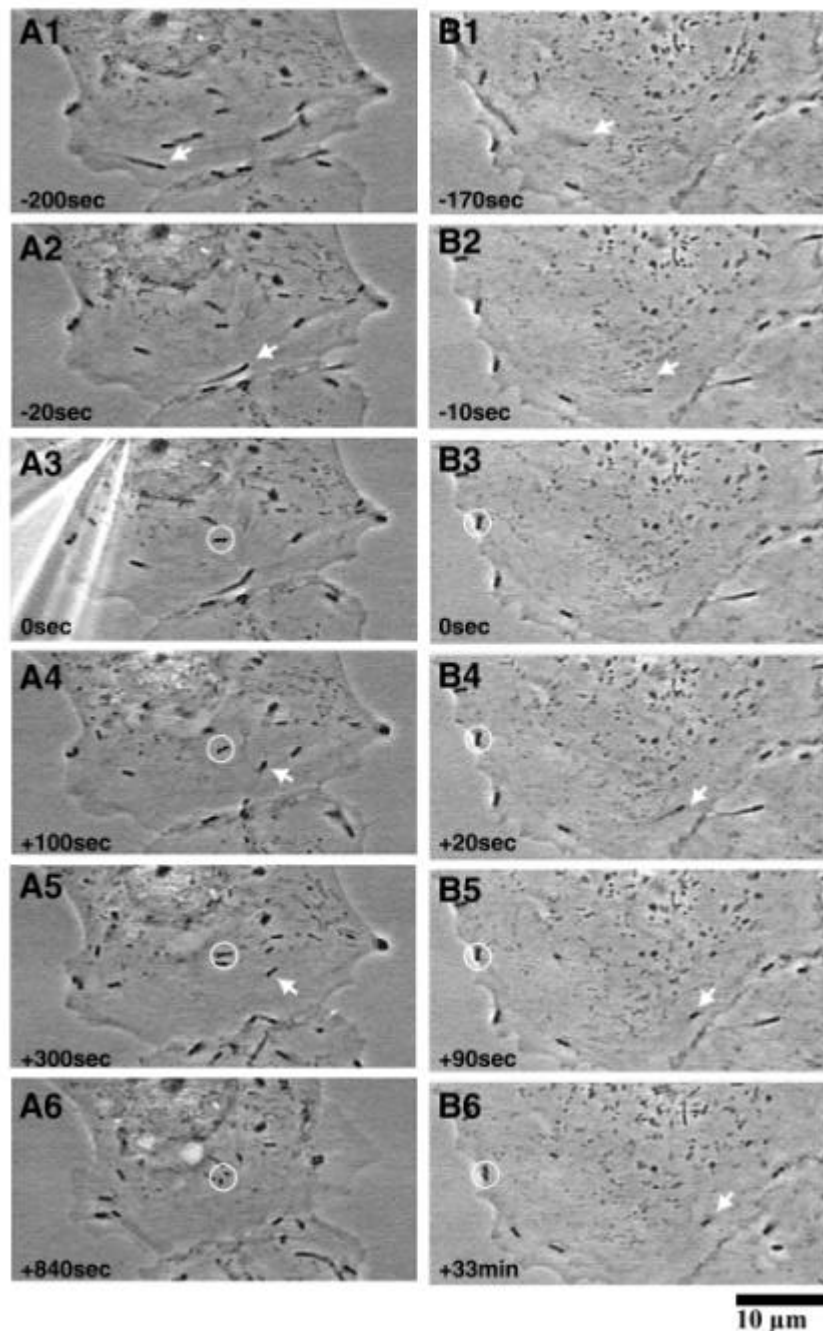


Abbildung 10 zeigt Videosequenzen, die den direkten Einfluß der ActA Antikörper 349D4 (A) und 358C1 (B) auf die Bewegung von *Listeria monocytogenes* in PtK2 Zellen veranschaulichen.

A1-6: 1 mg/ml 349D4 wurden injiziert. Videosequenz von -200sec, -20sec vor der Injektion, 10sec, 300sec und 840sec nach der Injektion. A1-3 zeigen die sich intrazellulär bewegendes Listerien mit Aktinschweif (siehe Pfeil). 0 sec ist der Zeitpunkt der Injektion, das in der kreisförmigen Markierung hervorgehobene Bakterium ist gerade in der Teilungsphase befindlich, dies wird in dem weiteren Verlauf der Sequenz deutlich. In A6 ist zu erkennen, wie sich beide Listerien voneinander fortbewegen. Der Pfeil markiert ein sich langsam weiterbewegendes Bakterium mit einer Geschwindigkeit von 0,05 µm/sec.

B1-6: 1 mg/ml 358C1 wurden injiziert. Videosequenz von -170 sec, -10 sec vor der Injektion, 20 sec, 90 sec, 33 min nach der Injektion. B1-3 zeigen die sich intrazellulär bewegendes Listerien mit Aktinschweif (siehe Pfeil). 0 sec ist der Zeitpunkt der Injektion. Zwischen 20 und 90 sec nach der Injektion stoppt die intrazelluläre Bewegung der Listerien (siehe Pfeile). In B4-6 ist ein sich teilendes Bakterium markiert (Ring), das sich nach Abschluß der Teilung nicht weiterbewegt.

In Phasenkontrastaufnahmen konnte nachgewiesen werden, daß die Bakterien nicht in ihrer Bewegung stoppten und später die intrazelluläre Bewegung wieder aufnahmen, sondern nach Injektion die Bewegung durch das Zytoplasma der Zelle mit verminderter Geschwindigkeit fortsetzten. Messungen ergaben eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,05 µm/sec nach der Injektion, im Gegensatz zu 0,3 µm/sec vor der Injektion (Abbildung 10A1-6 Pfeilmarkierung). Außerdem konnte beobachtet werden, daß sich Listerien auch nach der Teilung mit verminderter Geschwindigkeit durch das Zytoplasma der Zelle bewegen (Abbildung 10A1-6 Ringmarkierung).

Durch die Mikroinjektion der Antikörper 191E7/358C1 stoppten die sich intrazellulär bewegendenden Listerien sofort. Auch nach einer Teilung der Listerien und einer anschließenden längerfristigen Beobachtung konnte keine erneute, gerichtete Bewegung innerhalb des Zytoplasmas festgestellt werden. Diese Teilung der Listerien bildet die Grundlage der Mikrokolonien, wie sie in den vorangegangenen Versuchen bei der Injektion der Antikörper 191E7/358C1 beobachtet wurde (Abbildung 10B 1-6).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die mikroinjizierten Antikörper 358C1, 191E7, 349D4 und die polyklonalen Antikörper 119 einen deutlichen Effekt auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien haben. Es spielte dabei keine Rolle, ob die Antikörper vor oder während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* mikroinjiziert wurden. Die Antikörper inhibieren nicht die Rekrutierung von Aktin oder des Arp2/3-Komplexes. Schlußfolgernd besitzt der Aminosäurebereich 84-97 von ActA einen Einfluß auf die intrazelluläre Bewegung von *Listeria monocytogenes*. Bekannte Bindungsproteine konnten durch die Bindung der Antikörper nicht eindeutig kompetitiert werden.

Auf Grund der vorangegangenen funktionellen Analyse der aktinvermittelten Bewegung, soll im folgenden untersucht werden, ob die eingesetzten Antikörper mit zellulären Proteinen kreuzreagieren. Somit können analoge Sequenzen zwischen ActA und Wirtszellproteinen aufgedeckt werden.

3.1.5 Kreuzreaktion von ActA-spezifischen Antikörpern im Western Blot und in der Immunfluoreszenz mit Wirtszellproteinen

Da die zuvor eingesetzten Antikörper 191E7, 358C1 und 349D4 eine funktionelle Wirkung auf die aktinvermittelte Bewegung von Listerien zeigten, wurde weiterhin untersucht, ob diese effektiven Antikörper mit Wirtszellproteinen kreuzreagieren können. Dieser Effekt könnte weitere Hinweise darauf geben, ob das Epitop des listeriellen Proteins ActA in Wirtszellproteinen konserviert ist und es in der eukaryontischen Wirtszelle potentielle analoge Proteine gibt.

Die Antikörper wurden auf unterschiedlichen, nicht infizierten Zellen im Western Blot und in der Immunfluoreszenz (Abbildung 11) analysiert. Dabei konnte im Western Blot nachgewiesen werden, daß auf humanem Gewebe eine deutliche Erkennung von Proteinen stattfindet (Abbildung 11A). Dort sind neben Gesamtzellextrakten auch gesamte Listerienextrakte des Listerien Wildtyps EGD (Spur 10) und der Deletionsmutante Δ ActA2 (Deletion des ActA Proteins in dem Aminosäurebereich 20-602/Spur 9) aufgetragen. Die Antikörper 191E7/358C1

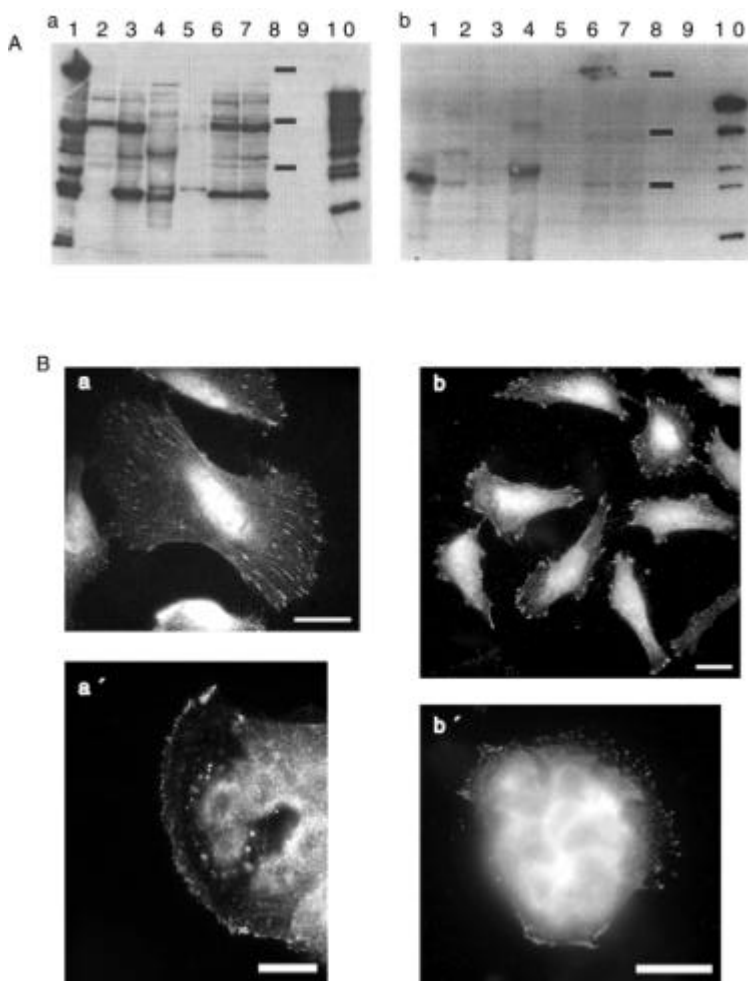


Abbildung 11 verdeutlicht die Kreuzreaktion der ActA Antikörper 191E7 und 349D4 in Western Blot mit unterschiedlichen eukaryonten Gesamtzellextrakten (A) und in immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit humanen Zellen (B).

A stellt die Kreuzreaktion der Antikörper 191E7 (a) und 349D4 (b) auf unterschiedlichen Zellextrakten dar. In Spur 1-10 wurden folgende Proben eingesetzt:

1. humane Thrombozyten
2. REF 52
3. HeLa
4. Maushirn
5. PtK2
6. CaCo2
7. Henle
8. Prestain Marker (Biorad) mit den Größen 104, 82 und 48 kDa
9. *L.monocytogenes* Extrakt Δ ActA2
10. *L.monocytogenes* Extrakt 7973

B zeigt immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-(a,b), von Caco2-Zellen (a',b'). In a und a' wurde der ActA 191E7 Antikörper, in b und b' der ActA 349D4 Antikörper verwendet.

In Abb. B wurden die primären Antikörper mit Cy3-konjugiertem Ziege-Anti-Maus Antikörper nachgewiesen.

Balken entsprechen 10 μ m

und 349D4 zeigen in dem Western Blot deutlich positive Reaktionen mit einem bzw. mehreren eukaryonten Proteinen.

In der Immunfluoreszenz konnte bei humanen Zellen, wie den HeLa-Zellen und den Darmepithelzellen Caco-2 eine Lokalisation nachgewiesen werden. Die Antikörper ActA 191E7 und 349D4 erkennen die Strukturen der „focal contacts“ (Abbildung 11B).

3.1.6 Suche nach den eukaryonten Analoga des listeriellen Proteins ActA

Es wurden Untersuchungen zur Identifizierung der eukaryontischen Proteine durchgeführt, die in der Immunfluoreszenzmikroskopie und im Western Blot mit den ActA spezifischen Antikörpern 191E7/358C1 und 349D4 kreuzreagieren. Neben der Immunpräzipitation mit humanem Thrombozytenextrakt, 2D-Elektrophorese mit HeLa-Extrakten und Identifizierung von kreuzreagierenden Proteinen über Western Blot, wurden die hierbei erhaltenen Spots mittels N-terminaler Proteinsequenzierung bzw. massenspektrometrischer Untersuchung näher charakterisiert, wobei allerdings keine eindeutige Analyse möglich war. Eine weitere Methode zur Identifizierung von Proteinen durch Antikörper kann mittels einer HeLa-Expressionsbibliothek erfolgen (siehe auch 2.3.4). Die Phagen, die unterschiedliche cDNA-Fragmente transkribieren und als Proteine präsentieren, werden auf Nitrozellulosefilter übertragen. Diese Nitrozellulosefilter werden wie Western Blots behandelt und mit den gewünschten Antikörpern inkubiert. Positiv reagierende Plaques werden isoliert und erneut gescreent. Nach mehreren dieser Durchgängen (siehe Abbildung 12) wird die c-DNA isoliert und sequenziert. Die Analyse konnte als erfolgreich abgeschlossen werden, die Ergebnisse werden in Tabelle 9 vorgestellt.

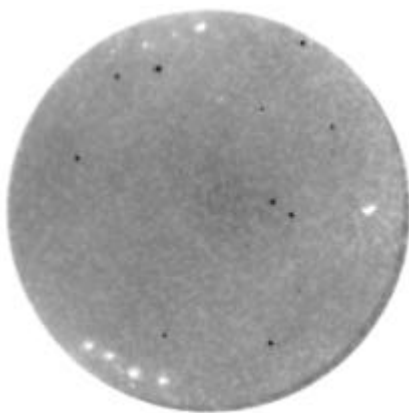


Abbildung 12: Dargestellt ist ein entwickelter Nitrozellulosefilter der zweiten Runde nach der Inkubation mit anti ActA 191E7, der der Identifizierung von m prp48 entspricht.

Eingesetzter Antikörper	Anzahl der positiven Klone	Identifizierung des Proteins
349D4	1	Ran binding protein
191E7	6	β -Importin Untereinheit
191E7	1	m prp48

Tabelle 9: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der HeLa-cDNA Expressionbibliothek

Es zeigte sich, daß sich nur das prolinreiche Protein Klon48 („proline rich protein“ prp48) durch den Vergleich der linearen Epitope als mögliches N-terminales ActA Analoga auszeichnete. Um den Nachweis zu erbringen, daß dieses Protein von dem ActA Antikörper 191E7 erkannt wird und ein ActA Analoga ist, wurden weitere Analysen durchgeführt.

Das Maus-Protein prp48 (m prp48) wurde von Ermekova et al. (1997) als ein Bindungspartner des FE65-Proteins durch „screening“ einer Maus-Expressionsbibliothek identifiziert, so daß ein Teil der Sequenz auf c-DNA- und Proteinebene bekannt war.

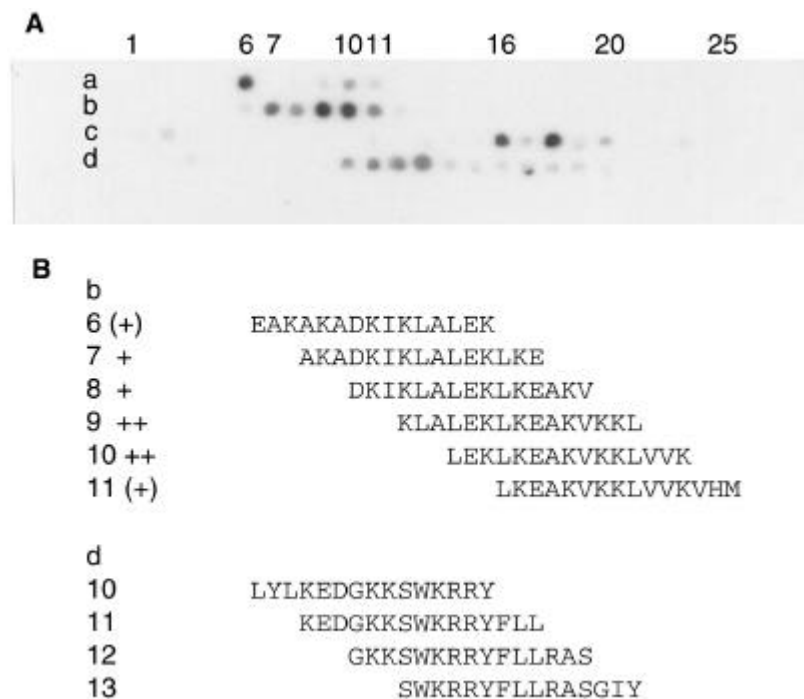


Abbildung 13: m prp48 Peptidscan mit dem monoklonalen ActA Antikörper 191E7 inkubiert.

A zeigt den Peptidscan mit positiven Peptidspots;

B Sequenzen der positiven Peptidspots aufgeschlüsselt.

3.1.7 Identifizierung des Proteins prp48 als analoges, eukaryontes Protein von ActA

Zunächst sollte bestätigt werden, daß das postulierte lineare Epitop des m prp48-Proteins von dem ActA Antikörper 191E7 erkannt wird. Es wurde aus der in der Datenbank bekannten Sequenz ein Peptidscan mit synthetischen Peptiden hergestellt. In Abbildung 13 ist das Ergebnis dieser Inkubation dargestellt. Es werden zwei lineare Sequenzen identifiziert, wobei die Spots b 6-11 erheblich deutlicher erkannt werden. Die Sequenzen entsprechen der postulierten analogen Sequenz von ActA mit den Aminosäuren KADLIKLALKEAK (siehe Abbildung 14). Die zweite lineare Sequenz, die durch den Antikörper mit einer weitaus geringeren Effizienz identifiziert wurde, ist auf dem Peptidscan d 10-13 lokalisiert und zeichnet sich durch die Aminosäuren SWKRRY aus. Weitere positive Reaktionen werden als unspezifisch eingeschätzt, da keine übereinstimmende Intensität der Spots vorhanden ist.

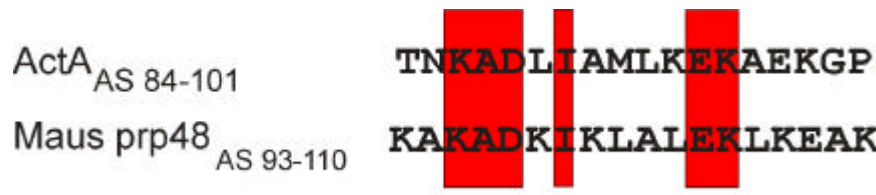


Abbildung 14: „alignment“ der Epitope des ActA Antikörpers 191E7 und der potentiellen m prp48 Bindungsstelle desselben Antikörpers

Dargestellt ist das lineare Epitop des ActA Antikörpers 191E7, welches durch die Inkubation mit einem ActA Peptidscan ermittelt wurde. Im Vergleich ist die lineare Erkennungssequenz von m prp48 gezeigt. Hierbei sind identische Aminosäuren rot unterlegt,

3.1.8 Klonierung der c-DNA des humanen prp48 Proteins aus HeLa-RNA durch „rapid amplification of c-DNA ends“ (RACE)

Mit der Sequenzinformation des m prp 48 wurde die „Expressed sequence tag“ (EST) Datenbank am National Center for Biology Information (NCBI) durchsucht und ein homologer humaner EST-Klon gefunden. Nach doppelsträngiger Sequenzierung konnte festgestellt werden, daß es sich um eine nicht vollständige cDNA-Sequenz handelt. Es konnte zu diesem Zeitpunkt durch Datenbank- und Literaturrecherche nicht gewährleistet werden, daß das 5'-Ende den richtigen Startpunkt für die Translation des Proteins enthält und außerdem konnte kein STOP-Codon identifiziert werden.

Durch einen Homologie-Vergleich zwischen bekannter humaner und bekannter Maus Sequenz wurden Primer nach der empfohlenen Vorlage der Arbeitsanleitung RACE von der Firma

Clontech hergestellt. Diese wurden zunächst in einer RT Transkription getestet, womit kontrolliert wurde, daß sowohl die gewählte Primerkombination, als auch die RNA Extraktion fehlerfrei sind (siehe Abbildung 15). Daraufhin wurden eine 3' und 5' RACE durchgeführt, die zu einer Sequenz überlappenden c-DNA führte.

Jedes RACE-PCR-Produkt wurde in den TOPO TA-Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft.

Durch die Anwendung der RACE-PCR konnten der Transkriptionsstart und das STOP-Codon identifiziert werden. Anschließend war es möglich, spezifische Oligos in einer RT-PCR einzusetzen und die gewünschte, humane cDNA des prp 48-1 vollständig zu amplifizieren.

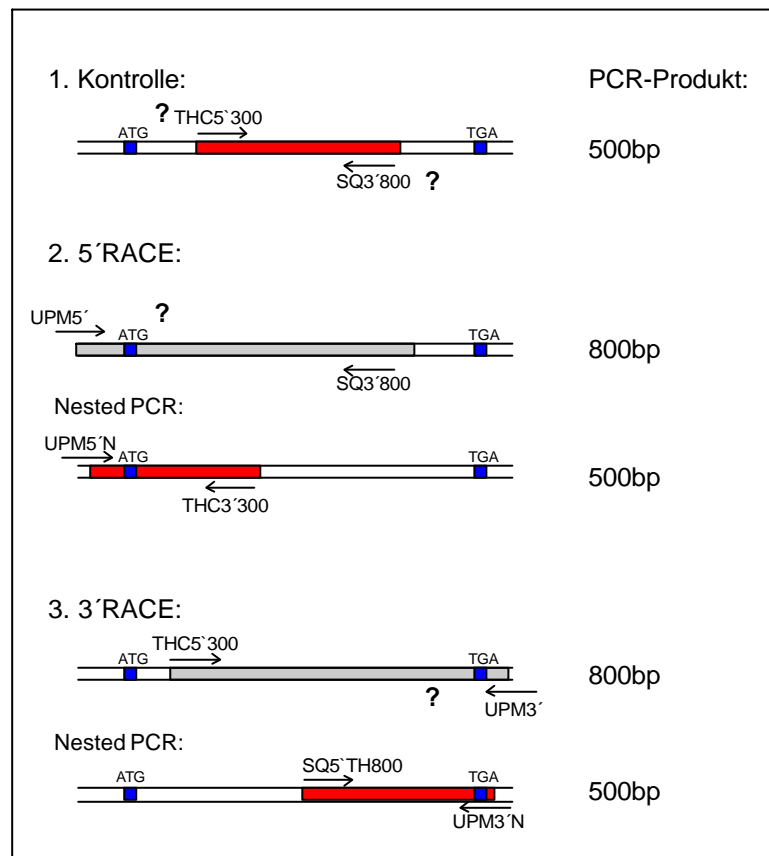


Abbildung 15: Schematische Darstellung der RACE-Strategie mit Angaben von benutzten Oligonukleotiden und der erhaltenen PCR-Produktgrößen.

3.1.9 Isolierung der c-DNA prp48-1 von RNA aus HeLa-Zellen durch RT-PCR

Aus den molekularbiologischen Daten der RACE-PCR für die prp 48-1 c-DNA konnten nun 3'- und 5'- spezifische Oligonukleotide hergestellt werden (RTprp48-5' und RTprp48-3'), die in einer RT-PCR mit mRNA aus HeLa-Zellen eingesetzt wurden. In Abbildung 16 ist die Amplifikation der c-DNA gezeigt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den TOPO TA-Vektor ligiert und vollständig sequenziert.



Abbildung 16: Dargestellt ist das RT-PCR-Produkt von hu prp48-1 aus HeLa-mRNA. Spur 1 ist der Molekulargewichtsmarker 100bp (NEB) aufgetragen, Spur 2 zeigt das RT-PCR-hu prp48-1 Produkt mit einer Größe von ca. 1kb.

3.1.10 GFP-hu prp48-1 lokalisiert in REF52-Zellen in „focal contacts“

Die c-DNA von hu prp48-1 (siehe 3.1.9) wurde über PCR mit geeigneten Oligonukleotiden (Prp5'N1Hi und Prp48N13`Ec2), die mit Restriktionsschnittstellen modifiziert wurden, amplifiziert und in den Vektor pEGFP-N1 kloniert. Durch die Analyse bekannter Restriktionsschnittstellen und Sequenzierung des Gens kann die Klonierung kontrolliert werden. Die transiente Expression des GFP-Fusionsproteins in REF52-Zellen (rattenembryonale Fibroblasten) zeigt die Lokalisation des GFP-hu prp48-1 Fusionsproteins in den „focal contacts“ (siehe Abbildung 17).

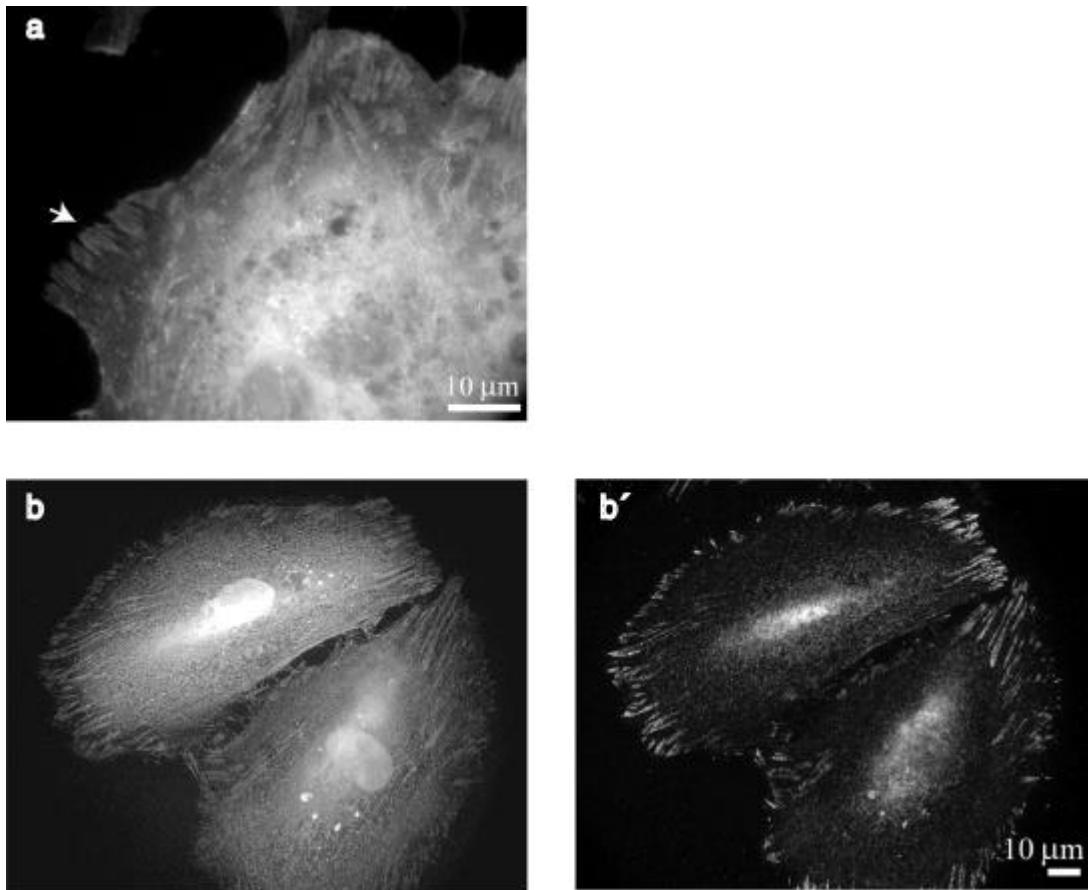


Abbildung 17: GFP-hu prp48-1 Lokalisation in REF52-Zellen.

a) Darstellung von hu prp48-1 transient exprimierenden REF52-Zellen,

b) REF52-Zellen transient exprimierendes GFP-hu prp48-1 b') und indirekte Gegenfärbung mit anti-Mena B49C12(siehe Tabelle 3a)

3.1.11 Die prp48-Familie

Nach der Identifizierung des Maus prp48-Proteins und der Klonierung der humanen prp48-1 c-DNA mit Hilfe der EST-Klone konnte, über Datenbanksuche des "NCBI" eine weitere Sequenz ausfindig gemacht werden, die eine starke Homologie zu hu prp48-1 besitzt. Dieses Protein wurde als hu prp48-2 („accession“ AK000812) bezeichnet und zeigt bis auf den C-Terminus, der mit der Aminosäure 261 beginnt, eine komplette Übereinstimmung der Sequenz von hu prp48-1. Abbildung 18 zeigt ein „alignment“ der die Aminosäuresequenzen des m prp48, des hu prp 48-1 und des hu prp48-2 zusammenfaßt.

```

mprp48      .....
hu prp48-1  MGESSEDIDQMFSTLLGEMDLLTQSLGVDTLPPDPNPPRAEFNYSVGFKDLNE
hu prp48-2  1 MGESSEDIDQMFSTLLGEMDLLTQSLGVDTLPPDPNPPRAEFNYSVGFKDLNE

mprp48      1 ..... EFKPDLVADISEAEQRTIQAQKESQNQDRFALLRASDGQGTAA
hu prp48-1  SLNALEDQDLDALMADLVADISEAEQRTIQAQKESLQNQHHSASLQASIFSGAA
hu prp48-2  55 SLNALEDQDLDALMADLVADISEAEQRTIQAQKESLQNQHHSASLQASIFSGAA

mprp48      44 SGGYGASAAAIDVSHHEEALPPPPVEPMLDLLPPPPPPPEL LSKEEEEEAKAKAD
hu prp48-1  SLGYGTNVAAATGISQYEDDLPPPPADPVLDLPLPPPPPEP LSQEEEEEAQAKAD
hu prp48-2  109 SLGYGTNVAAATGISQYEDDLPPPPADPVLDLPLPPPPPEP LSQEEEEEAQAKAD

mprp48      98 KIKLALEKLKEAKVKKL VVKVHMDSS STKSLMVDERQLARDVLDNLFKTHCDC
hu prp48-1  KIKLALEKLKEAKVKKL VVKVHMDN NSTKSLMVDERQLARDVLDNLFKTHCDC
hu prp48-2  162 KIKLALEKLKEAKVKKL VVKVHMDN NSTKSLMVDERQLARDVLDNLFKTHCDC

mprp48      152 NVDWCLYEIYPELQIERVFEDHENVVEVLSDWTRDTENKVL FLEKE
hu prp48-1  NVDWCLYEIYPELQIERFFEDHENVVEVLSDWTRDTENKIL FLEKE
hu prp48-2  214 NVDWCLYEIYPELQIERFFEDHENVVEVLSDWTRDTENKIL FLEKE

mprp48      198 ER YAVFKNPQNFYLDNKGKKENKETNEKMNAKNKEYLLEESFCGTSIIIVPELEGA
hu prp48-1  EK YAVFKNPQNFYLDNRGKKESKETNEKMNAKNKESLLEAYFYNMPLY 310
hu prp48-2  262 FRRSPSISSISAVMTQEPLTSGSWEYG 289

mprp48      253 LYLKEDGKKWKRRYFLLRASGIYYVPKERQRHPAIWHVLYSLKM 297

```

Abbildung 18: „alignmet“ der prp48-Familie

Gelb unterlegte Bereiche heben gleiche Aminosäuren hervor, orange unterlegte Bereiche heben weitere homologe Bereiche zwischen m prp48 und hu prp48-1 hervor, blau unterstrichener Bereich zeigt die Bindungsstelle des ActA-Antikörpers 191E7 auf.

Über die Eingabe der Aminosäuresequenz der humanen Proteine in Datenbanken („swiss prot“) wurden die theoretischen Daten dieser Proteine bestimmt (Tabelle 9). Im Anhang dieser Arbeit sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Proteine dokumentiert, die diesem Vergleich zugrunde liegen.

Bezeichnung	AS-Länge	Mw (Da)	Theoretischer Isoelektrischer Punkt	Zelllinie/Gewebe
hu prp48-1	310	35160	4,23	HeLa
hu prp48-2	288	32178	4,09	Adipozyten

Tabelle 9.: Zusammenfassung der Daten der hu prp 48 Proteine

3.1.12 Charakterisierung des prp 48-Proteins

Die Aminosäuresequenz des m prp48 ließ vermuten, daß das Protein ein möglicher Bindungspartner für die EVH1-Domäne von Mena ist, da das Aminosäuremotiv L(P)_x im prp48 enthalten ist. Niebuhr et al. (1997b) und Sudol et al. (1998) zeigten, daß die EVH1-Domäne von

Mena nicht nur das FPPPP-Motiv, sondern auch ein LPPPP-Motiv als Bindungspartner akzeptiert. Der Peptidscan m prp48 wurde zunächst mit den polyklonalen Antikörpern-GST 174 und dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (nicht gezeigt). Dadurch ist gesichert, daß dieser Nachweis keinen unspezifischen Hintergrund durch die Antikörper aufweist.

Der Peptidscan m prp48 wurde mit 2 mg/ml GST inkubiert und mit den oben beschriebenen Antikörpern nachgewiesen, es konnte keine deutliche GST Bindung nach einer Expositionszeit von 15 sec mit dem Peptidscan festgestellt werden (Abbildung 19a).

Durch die Inkubation des Fusionsprotein GST-EVH1-Mena (AS 1-114) in einer Konzentration von 2 mg/ml konnten die Spots a19-25 und b1 als positiv identifiziert werden, die Expositionszeit betrug hier 1 sec (siehe Abbildung 19b). Wie in Abbildung 19c dargestellt bindet die EVH1-Domäne von Mena an die L(P)_x Motive des prp 48.

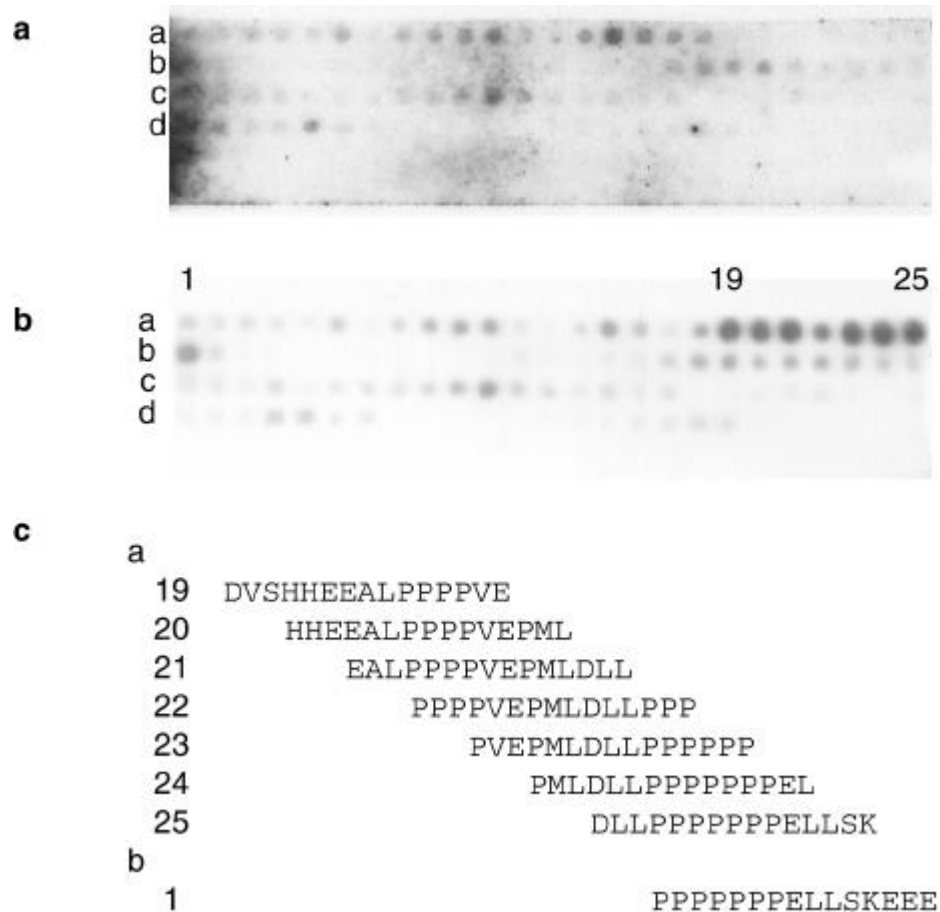


Abbildung 19: Charakterisierung der Bindung der Mena EVH1-Domäne an m prp48

Inkubation der aufgereinigten Proteine GST (a) und GST-EVH1 Mena (b) auf dem m prp48 Peptidscan. (c) zeigt die Sequenzen der positiven Peptide, die GST-EVH1 Mena bindet

3.2 Herstellung von GFP-Antikörpern

Das grün fluoreszierende Protein, kurz GFP genannt, wird als Fusionsprotein zusammen mit dem zu untersuchenden Protein exprimiert, um dies in seiner Lokalisierung und Dynamik in lebenden Zellen beobachten zu können. Durch die Klonierung des *gfp* Gens und die dadurch ermöglichte Expression in heterologen Systemen wurde GFP als ein neues vielversprechendes genetisches Reportersystem etabliert (Prasher et al. 1992, Inouye and Tsuji 1994). Wird es in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen exprimiert und mit blauem oder ultraviolettem Licht angeregt, so emittiert es ein helles, grünes Licht. GFP besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 395 nm und ein kleineres Maximum bei 475 nm. Das emittierte grüne Licht liegt mit einem Maximum bei 508 nm (Cubitt et al. 1995). Diese durch Licht stimulierte Fluoreszenz benötigt keine weiteren Kofaktoren oder Substrate. Das Protein GFP bietet außerdem deutliche biochemische Vorteile, da es sehr stabil ist und bis zu einer Temperatur von 65°C, einem pH Wert von 11, 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 6 M Guanidiniumchlorid fluoresziert. Außerdem ist es gegen die meisten Proteasen über mehrere Stunden resistent (Gubin et al. 1997), welches für die Verwendung in zellulären Systemen als Reportergen eine wichtige Rolle spielt.

Die an GFP gekoppelten Proteine können *in situ* beobachtet werden, wodurch der Schritt eines indirekten Nachweises vermieden werden kann. Diese *in vivo* Beobachtung findet in Echtzeit statt, so daß zelluläre Prozesse, wie z.B. Motilität der Zellen mit der Intensität des GFP-Fusionsproteins korreliert werden kann (Rottner et al. 1999).

Die Verwendung von rekombinanten GFP-Fusionsproteinen anstelle von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern oder Proteinen hat eine Reihe von Vorteilen. Durch die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen kann auf die Zellfixierung und Permeabilisierung der Zellmembran zur Vorbereitung der indirekten Immunfluoreszenz verzichtet werden. Außerdem wird unspezifischer Hintergrund reduziert, welcher durch unspezifisch gebundene Primär- und Sekundärantikörper verursacht wird. Der Einsatz von aufgereinigtem an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Proteine in Zellen ist sehr aufwendig, da das endogene oder rekombinante Protein erst aufgereinigt und anschließend gekoppelt werden muß. Die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes soll zum einen stark genug sein, um das Protein detektieren zu können, zum anderen darf es die Funktion des zu untersuchenden Proteins nicht beeinträchtigen. Außerdem zeigt GFP eine höhere Sensitivität und Auflösung sowie eine höhere Resistenz gegen „Fotobleaching“ während digitaler Videomikroskopie (Wang and Hazelrigg 1994, Niswender et al. 1995).

Bei der Verwendung von Fusionsproteinen muß sichergestellt sein, daß sich diese wie die entsprechenden, endogenen Proteine verhalten. Diese Überprüfung kann durch biochemische Analysen erfolgen, wobei die Fusionsproteine mit den endogenen Proteinen in ihren Eigenschaften verglichen werden können (Geese et al. 2000). Eine weitere Möglichkeit für die Überprüfung der endogenen Proteinfunktion kann die Verwendung von GFP Antikörpern sein, die als ein Werkzeug dienen, um GFP mit den gekoppelten Proteinen mit unterschiedlichen immunchemischen Methoden oder in Modellsystemen nachweisen zu können. Durch Western Blot Analyse mit transfizierten Zellextrakten kann das Molekulargewicht und eventuelle Abbauprodukte des Fusionsproteins bestimmt werden.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wird häufig die Glutharaldehyd fixierung angewandt. Insbesondere monoklonale Antikörper können nach dieser Fixierungsmethode ihr Antigen häufig nicht mehr erkennen, da das Epitop durch die Fixierung verändert wird. Ein Antikörper, der GFP erkennt, kann somit universell für das rekombinante Protein eingesetzt werden und auf elektronenmikroskopischer Ebene hilfreich für die Lokalisierung von Proteinen sein. Ein weiterer Anwendungsbereich von GFP-Antikörpern ist die Möglichkeit der Immunpräzipitation. Rekombinant exprimierte Fusionsproteine können aus Zellen durch Immunpräzipitation isoliert werden, um weitere biochemische Analysen anzuschließen. Weiterhin können derart isolierte Proteinkomplexe in ihrer Zusammensetzung charakterisiert werden, um Bindungspartner des endogenen Proteins zu identifizieren.

Vor diesem Hintergrund sollten sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper gegen GFP hergestellt werden. Für die Immunisierungen wurde gereinigtes natives und Glutharaldehyd behandeltes GFP (aus der Arbeitsgruppe V. Small zur Verfügung gestellt) eingesetzt.

3.2.1 Herstellung von monoklonalen GFP-Antikörpern

Drei BALB/c Mäuse wurden mit je 100 µg aufgereinigtem GFP, d.h. einem Gemisch aus nativem und Glutharaldehyd behandeltem GFP, immunisiert. Die Hybridomüberstände wurden auf gereinigtem, nativem GFP im ELISA getestet. Positive Überstände mit einer Extinktion von über 0,2 OD wurden im Western Blot mit aufgereinigtem GFP und mit SDS Gesamtzellextrakt von stabil transfizierten GFP-VASP-B16F1 Zellen (Maus Melanom Zelllinie) analysiert. Weiter wurden die antikörperhaltigen Überstände in der Immunfluoreszenz getestet. Hierfür wurden die mit Paraformaldehyd und Glutharaldehyd fixierten stabilen GFP-VASP-B16F1 Zellen mit den Überständen der monoklonalen Antikörper inkubiert und über einen Fluorochrom-konjugierten, sekundären Antikörper nachgewiesen. Die vorher positiv selektierten Antikörper der Überstände wurden auf die Fähigkeit der Immunpräzipitation getestet. Zu diesem Zweck wurden die

spezifischen monoklonalen Antikörper an Protein-G Agarose gebunden, diese mit stabil transfizierten GFP-VASP-B16F1 Zellextrakten inkubiert, entsprechend prozessiert und im Western Blot auf die präzipitierten Proteine VASP und GFP analysiert. Die im folgenden Teil dargestellten monoklonalen GFP-Antikörper wurden auf diese Weise charakterisiert. Die Identifizierung der linearen Epitope (Peptidscan als 15 mer mit 12 Aminosäuren Überlappung) ist in Tabelle 3a zusammengefaßt werden.

Anti-GFP 101G4

Nach Subklonierung mit Schwerpunkt auf Erkennung von GFP-Fusionsproteinen im Western Blot kann gezeigt werden, daß die Antikörper des Klons 101G4 das GFP-Fusionsprotein aus Gesamtzellextrakt deutlich erkennen. In Abbildung 20A ist die Erkennung des Fusionsproteins in Gesamtzellextrakt von GFP-VASP stabil exprimierenden B16F1-Zellen im Vergleich zu B16F1 Wildtyp Zellen dargestellt. Dabei kann eindeutig gezeigt werden, daß das GFP-Fusionsprotein spezifisch erkannt wird (siehe Abbildung 20A 2.Spur, GFP-VASP ist durch einen Pfeil markiert) und das Protein GFP-VASP ohne Degradation in den Zellen exprimiert wird, da keine zusätzlichen Banden (Abbauprodukte) erkannt werden. Die Subklasse des Antikörpers konnte als IgG2b, das Epitop des Antikörpers durch einen GFP-Peptidscan ermittelt werden (siehe Tabelle 3a).

Anti-GFP 270F3

In der Glutaraldehyd- (nicht gezeigt) und Paraformaldehydfixierung (siehe Abbildung 20B) von GFP-VASP stabil exprimierenden B16F1 Zellen zeichnete sich besonders dieser monoklonale Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz aus. Man kann deutlich erkennen, daß eine Kolokalisation von GFP-VASP und GFP in der indirekten Immunfluoreszenz durch den Antikörper 270F3 stattfindet. Wegen der Erkennung von Glutaraldehyd-fixierten Zellen bietet sich dieser Antikörper an, um GFP-Fusionsproteine in elektronenmikroskopischen Studien zu untersuchen. Auch hier wurde das Epitop des Antikörpers bestimmt. Es zeigte sich, daß die gleiche Aminosäuresequenz erkannt wird wie von den GFP 104G4 Antikörpern, daß es sich hierbei nicht um einen identischen Antikörperklon handelt, zeigt die Subklasse, die als IgG1 charakterisiert wurde.

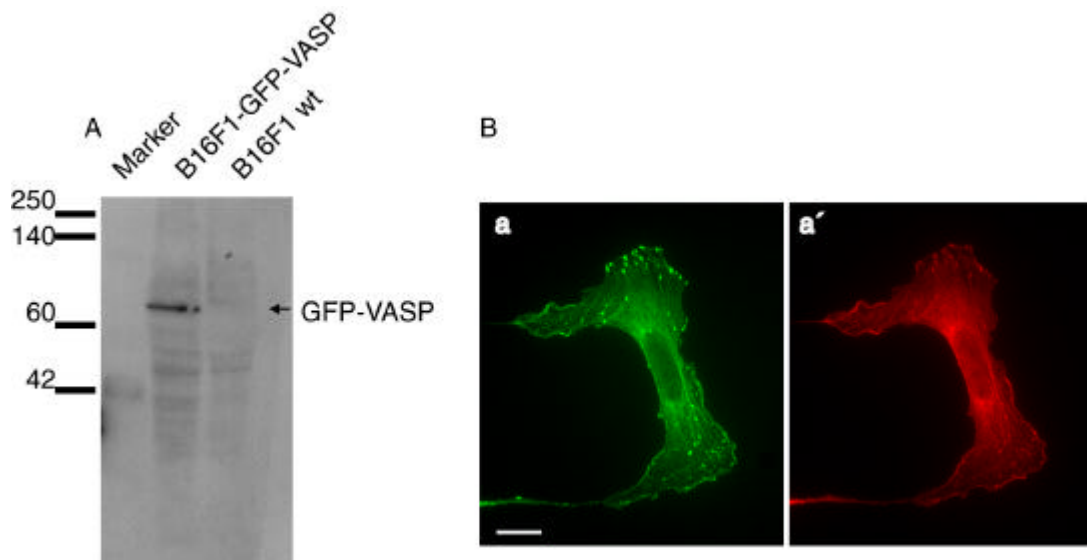


Abbildung 20A-B: Charakterisierung der monoklonalen GFP Antikörper

A) Western Blot mit GFP-VASP- und Wt-B16F1Gesamtzellextrakt inkubiert mit aGFP 101G4

B) Aufnahme einer GFP-VASP stabil exprimierenden B16F1 -Zelle (a), die in a' mit aGFP 270F3 nachgewiesen und Alexa 594 konjugiertem Sekundärantikörper analysiert wurde; Balken entspricht 10 µm

Anti-GFP 27F5

Der Antikörper 27F5 ist sehr gut für die Immunpräzipitation von GFP-Fusionsproteinen geeignet. Nach der Charakterisierung mit Extrakten von stabil exprimierenden GFP-VASP-B16F1-Zellen wurde dieser Antikörper für weitere Immunpräzipitationen ausgewählt. Die an Sepharose A gekoppelten Antikörper wurde mit verschiedenen Zellextrakten inkubiert, in denen unterschiedliche GFP-Fusionsproteine durch Zellen exprimiert wurden, zum einen GFP-VASP, zum anderen GFP-Zyxin. Aus diesen Zellextrakten konnten von dem Antikörper die GFP-Fusionsproteine isoliert werden. Abbildung 20C zeigt die Isolierung der Fusionsproteine aus Extrakten von stabil transfizierten GFP-VASP-B16F1 Zellen (Abbildung 20C a) und NRK Zellen mit GFP-Zyxin (Abbildung 20C b). Eine Kontrolle der Immunpräzipitation erfolgte durch die Inkubation mit Zellextrakten von nicht transfizierten B16F1-Zellen (Abbildung 20Ca, Spur 2). Der Nachweis der präzipitierten GFP-Fusionsproteine erfolgte im Western Blot mit dem Antikörper 101G4. Für die Zelllinie der B16F1 stabil transfizierten VASP-Zellen konnte festgestellt werden, daß endogenes VASP kopräzipitiert werden kann (nicht gezeigt).

Die Immunpräzipitation des GFP-Zyxin Fusionsproteins (Abbildung 20Cb 1 und 2) wurde durch zwei Western Blot erbracht, ein Blot wurde mit dem Antikörper 101G4, der andere mit dem Zyxin Antikörper 184C1 inkubiert und nachgewiesen. Auf beiden Blot wurde das Immunpräzipitat GFP-Zyxin erkannt. Somit ist gezeigt, daß der monoklonale GFP Antikörper 27F5 generell für die Immunpräzipitation eingesetzt werden kann.

Von dem Antikörper 27F5 wurde das Epitop bestimmt und in Abbildung 20D dargestellt.

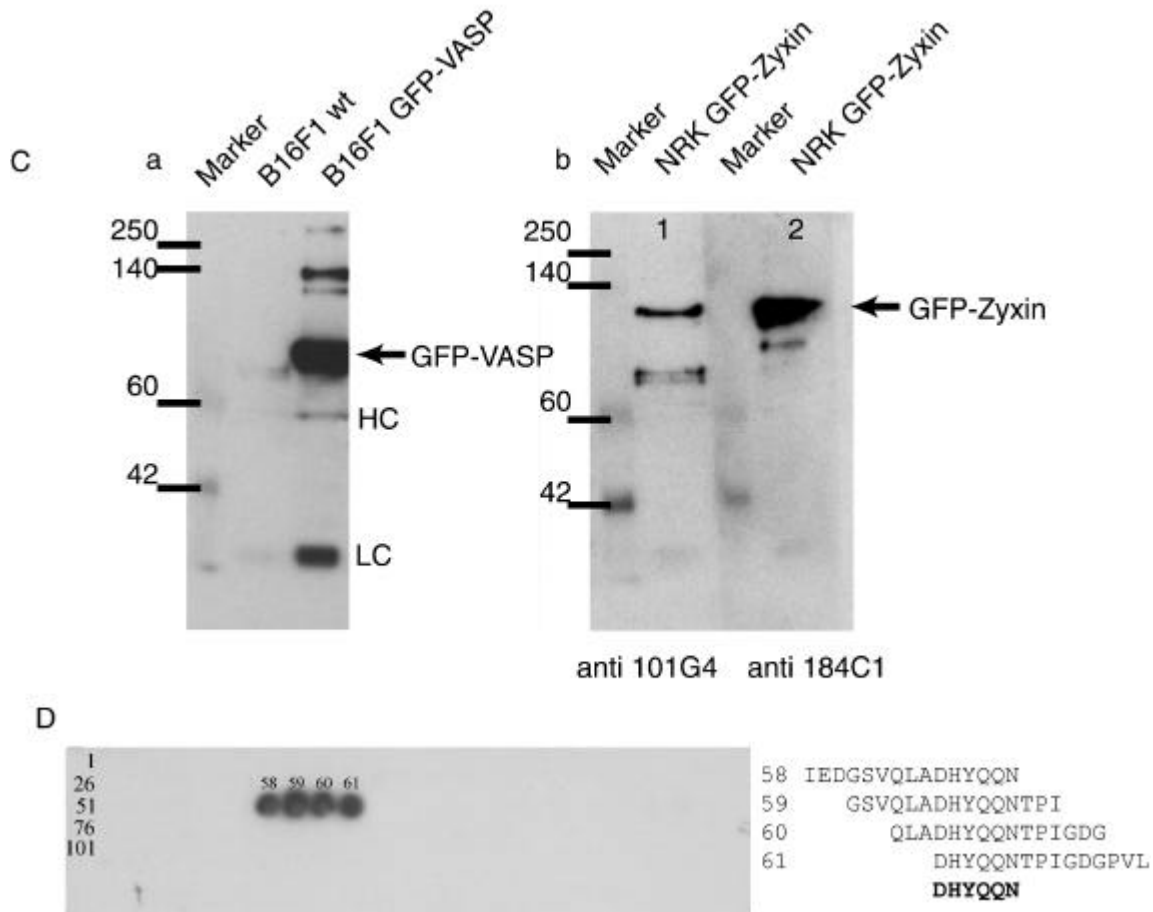


Abbildung 20C und D: Charakterisierung des GFP Antikörpers 27F5

C) Immunpräzipitation von a) B16F1 Wt- und GFP-VASP stabil transfizierten Zellen nachgewiesen durch den GFP-Antikörper 101G4; b) GFP-Zyxin stabil transfizierte NRK-Zellen, nachgewiesen durch den Antikörper GFP 101G1 (siehe 1) und den Zyxin Antikörper 184C1 (siehe 2).

D) Epitop-mapping des GFP-Antikörpers 27F5

3.2.2 Polyklonale GFP-Antikörper

Die Seren wurden, ebenso wie die monoklonalen Antikörper, auf gereinigtem GFP im ELISA, im Western Blot und in der Immunfluoreszenz mit Extrakten von B16F1 Zellen und auf Glutharaldehyd und Paraformaldehyd fixierten B16F1 Zellen getestet (nicht dargestellt). Die oben genannten Experimente verliefen positiv. Die Aufreinigung des Serums erfolgte mit gereinigtem GFP, das an CNBr-Sepharose gekoppelt wurde. Die aufgereinigten polyklonalen Antikörper wurden ebenfalls auf die Fähigkeit der Immunpräzipitation getestet. In Abbildung 20E ist die Immunpräzipitation der aufgereinigten polyklonalen Antikörper mit GFP-VASP-B16F1-Zellextrakt dargestellt.

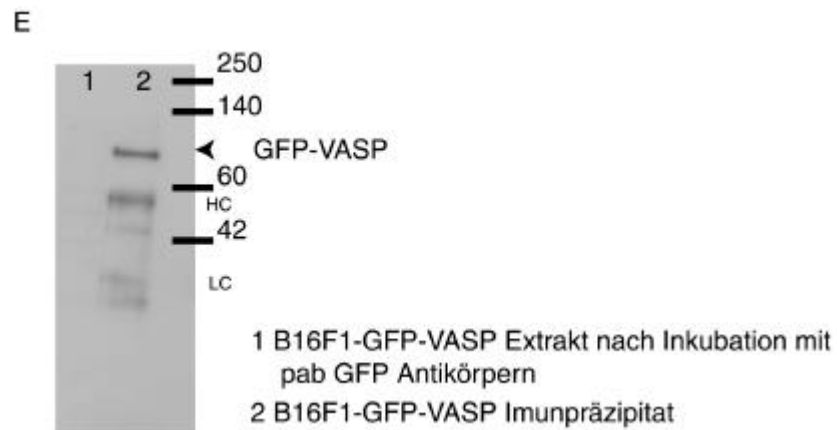


Abbildung 20E: Charakterisierung der aufgereinigten polyklonalen Antikörper in der Immunpräzipitation mit GFP-VASP stabil exprimierenden B16F1Zellen

Spur1 zeigt den Zellextrakt nach der Inkubation mit den polyklonalen Antikörpern, in Spur2 ist das Immunpräzipitat mit α 101G4 analysiert. Pfeil zeigt GFP-VASP an.

3.3 Untersuchung der Dynamik von Bindungspartnern des listeriellen Oberflächenproteins ActA

Wirtszellproteine, die über das Protein ActA an Listerien rekrutiert werden, gehören zu Proteinkomplexen, die notwendig sind, um der Zelle die entsprechende Dynamik durch das Aktinfilamentsystem zu verleihen. ActA rekrutiert die essentiellen Proteine wie den Arp2/3-Komplex und Aktin durch seinen N-Terminus (Pistor et al. 1995). Durch die Kombination dieser drei Proteineinheiten ist eine effektive Aktinnukleation gewährleistet und bildet die Grundlage für die aktinvermittelte Bewegung (Welch et al. 1998). Durch die Rekrutierung der Ena/VASP Proteinfamilie und ihrer Bindungspartner von Zytoskelettproteinen an ActA findet eine positive Wirkung auf die intrazelluläre Geschwindigkeit der Listerien statt (Niebuhr et al. 1997b).

Bei den hier untersuchenden Fusionsproteinen handelt es sich um Aktin, zwei Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes, dem Arp3 und dem p21-Arc, und um die Proteine der Ena/VASP-Familie, VASP und Mena.

Die Untersuchung der Lokalisation und Dynamik basiert auf der Methode der digitalen Fluoreszenzmikroskopie. Dies bietet den Vorteil die lebende Zelle in ihrer Bewegung im Hinblick auf die Dynamik der Zytoskelettproteine im Gegensatz zur indirekten Immunfluoreszenz beobachten zu können. Aus Videosequenzen wurden Einzelbilder entnommen, die die Dynamik der GFP-Fusionsproteine in den äußeren Bereichen der Lamellipodien und der Rekrutierung an die Listerien wiedergeben.

3.3.1 Lokalisation von GFP-Ena/VASP-Familienmitgliedern in PtK2 und B16F1 Zellen

Die c-DNA GFP-VASP wurde stabil in die wenig motilen PtK2 Zellen transfiziert, so daß eine kontinuierliche Expression des Fusionsproteins stattfand. In Abbildung 21a und in der Vergrößerung a' kann deutlich die Lokalisation in „focal contacts“, und an dem äußeren Rand des Lamellipodiums (siehe Pfeil) erkannt werden. Außerdem kann GFP-VASP an den äußersten Enden von Filopodien lokalisiert werden, die in PtK2 Zellen jedoch seltener auftreten. Eine signifikante Verteilung von GFP-VASP (Abbildung 21Ba und Rottner et al. 1999) und GFP-Mena (Abbildung 21Ba') kann mit einer sehr motilen Zelllinie, der Maus Melanomzelllinie B16F1, verdeutlicht werden. Diese Zellen bilden extreme Lamellipodien aus, bei denen eine ausgeprägte Führungslamelle vorhanden ist. GFP-VASP und GFP-Mena sind an dem äußersten Bereich der Führungslamelle lokalisiert, die sich wie ein Faden entlang des Lamellipodiums

zieht (Abb. 21B a/a'). Dicht dahinter können kleine, hoch dynamische „focal contacts“ lokalisiert werden. Im Gegensatz dazu steht Aktin, das sich als Gradient mit der höchsten Konzentration an der Membran befindet und von dort ausgehend in der Konzentration stetig abnimmt. Das Lamellipodium wird durch „focal contacts“ am Substrat festgehalten. Die Führungslamelle selbst ist nicht mit dem Substrat assoziiert, sondern frei und sehr beweglich. Videoaufnahmen zeigen, daß bei jedem expandierenden Lamellipodium GFP-VASP/Mena in dieser oben dargestellten Verteilung lokalisiert werden kann. Bei der Retraktion des Lamellipodiums findet eine Delokalisierung von GFP-VASP/Mena statt und daher nicht mehr sichtbar.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von V.Small (Abbildung 22, Rottner et al. 1999) mit der stabil transfizierten GFP-VASP B16F1 Zelllinie belegten die Lokalisation von GFP-VASP in der Führungslamelle und an den Spitzen der Filopodien (Abbildung 22a-c).

Der Vergleich von anderen „focal contact“ Proteinen wie Vinculin, Zyxin oder Paxillin, die teilweise Bindungspartner von VASP sind, zeigt sich in der indirekten Immunfluoreszenz eine Kolokalisation von GFP-VASP in den „focal contacts“, jedoch nicht in der Führungslamelle und den Spitzen der Filopodien. Die Abbildung 23 zeigt die indirekte Immunfluoreszenz zwischen Paxillin mit der Kolokalisation in dem Lamellipodium und GFP-VASP stabilen B16F1 Zellen in den „focal contacts“. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Kolokalisation nicht in der Führungslamelle vorhanden ist (nicht dargestellt Verteilung Zyxin und Vinculin zu VASP). Auch in einer Kolokalisation mit Aktin wird deutlich, daß Paxillin nicht an der Führungslamelle lokalisiert werden kann, sondern an den „focal contacts“, die das Lamellipodium an dem Substrat anheften.

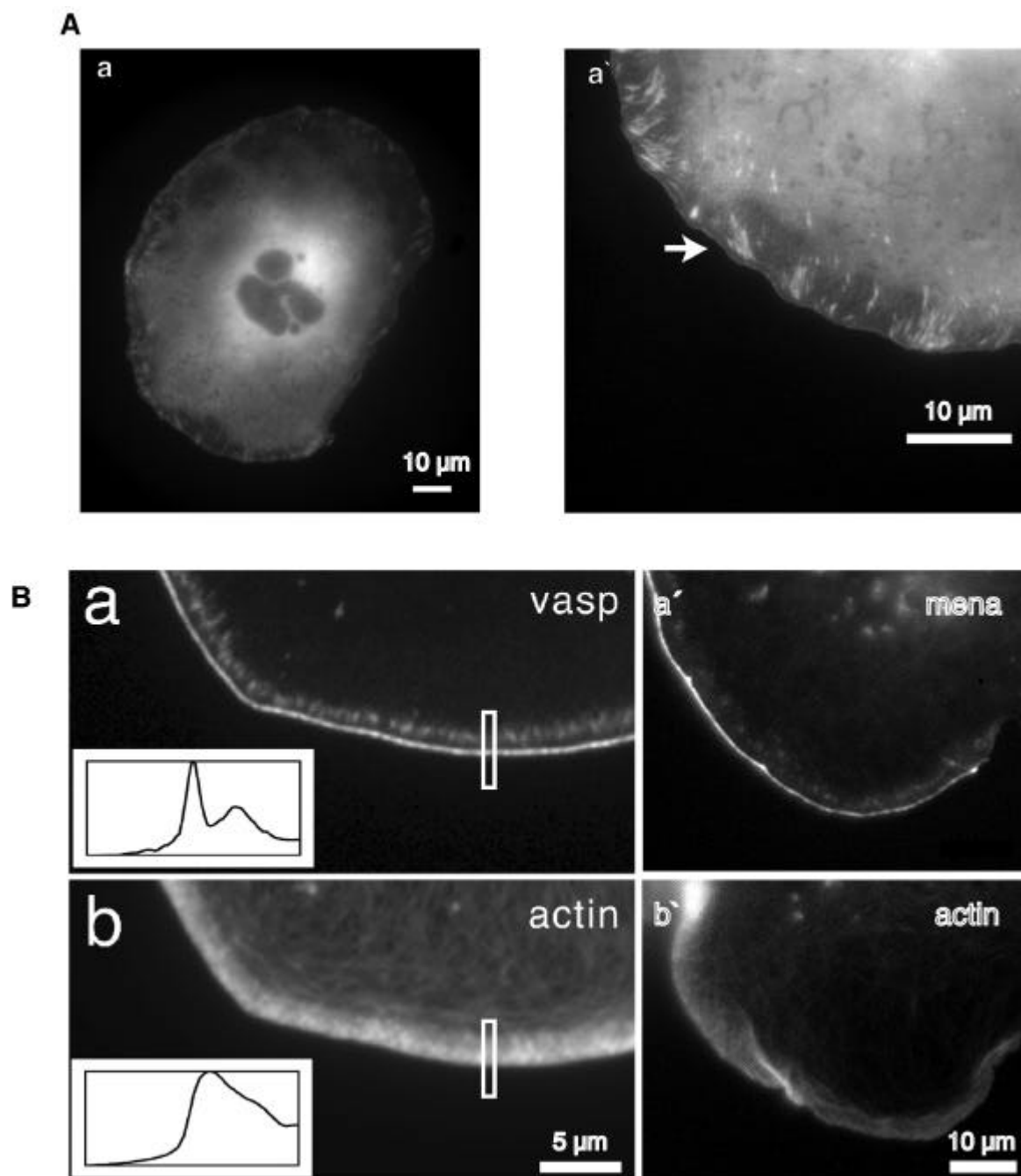


Abbildung 21: Videomikroskopische Darstellung von GFP-VASP und GFP-Mena in lebenden PtK2 und B16F1 Zellen

Aa) PtK2 Zellen mit GFP-VASP in a') zeigt die gleiche Zelle in einer Vergrößerung. Zu erkennen „focal contacts“ und durch den Pfeil gekennzeichnete Lamellipodium der Zelle, in dem GFP-VASP lokalisiert ist

Ba) zeigt eine mit GFP-VASP stabil transfizierte B16F1 Zelle im Vergleich zu b)F-Aktin, Messung der Intensitätsverteilung von GFP bzw. Cy3 konjugiertem Phalloidin; Abbildung freundlicherweise von K.Rottner zur Verfügung gestellt

Ba') zeigt eine GFP-Mena exprimierende B16F1 Zelle, GFP-Mena lokalisiert ebenfalls in den Spitzen der Führungslamelle und „focal contacts“ b')F-Aktin im Vergleich.

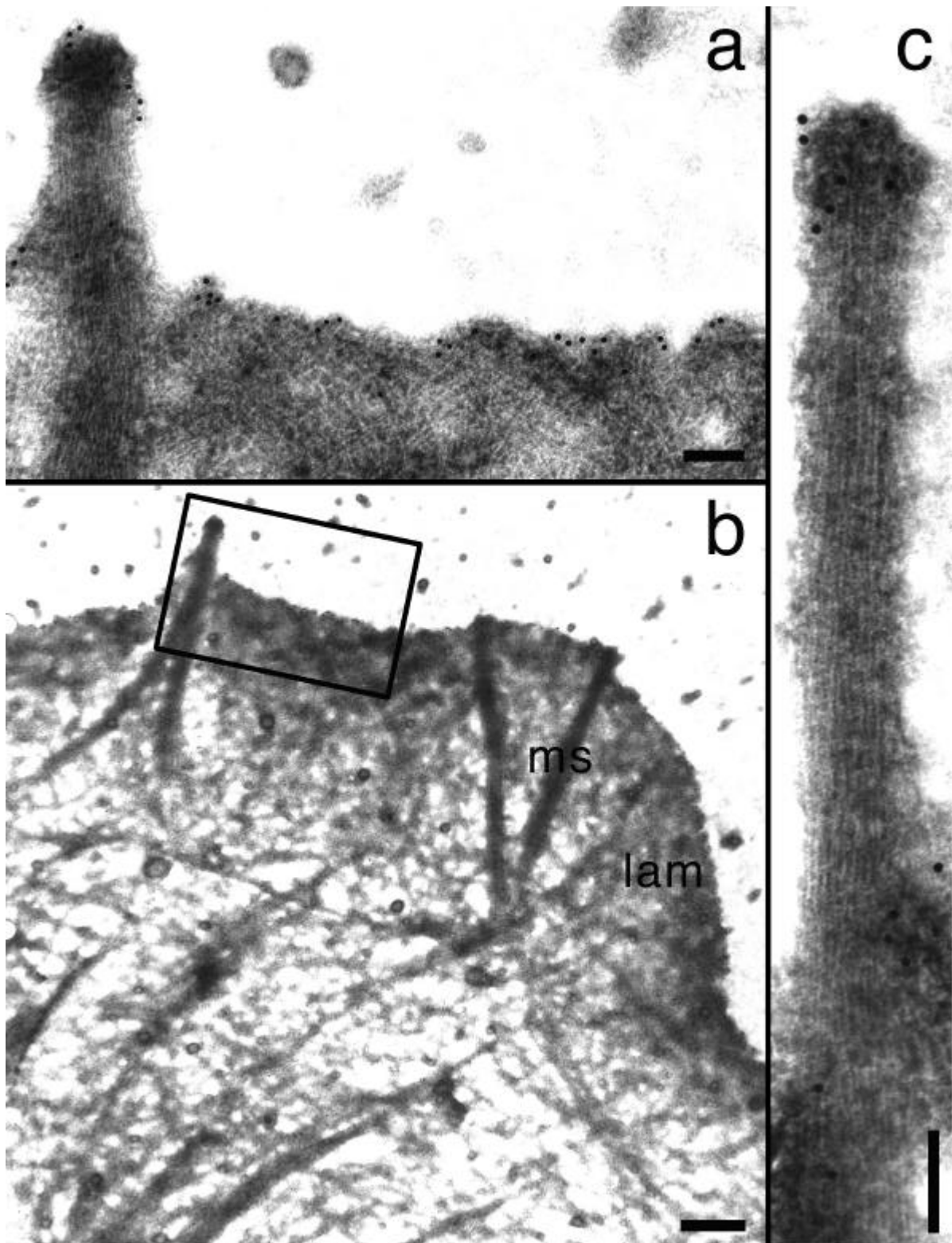


Abbildung 22: zeigt den elektronenmikroskopischen Nachweis von GFP-VASP in stabil exprimierenden B16F1-Zellen an der Führungslamelle a), b) und an den Spitzen der Filopodien b) , c) durch polyklonale GFP-Antikörper. Balken in a und c entsprechen 0,1 μm , in b 0,5 μm . freundlicherweise von V.Small zur Verfügung gestellt

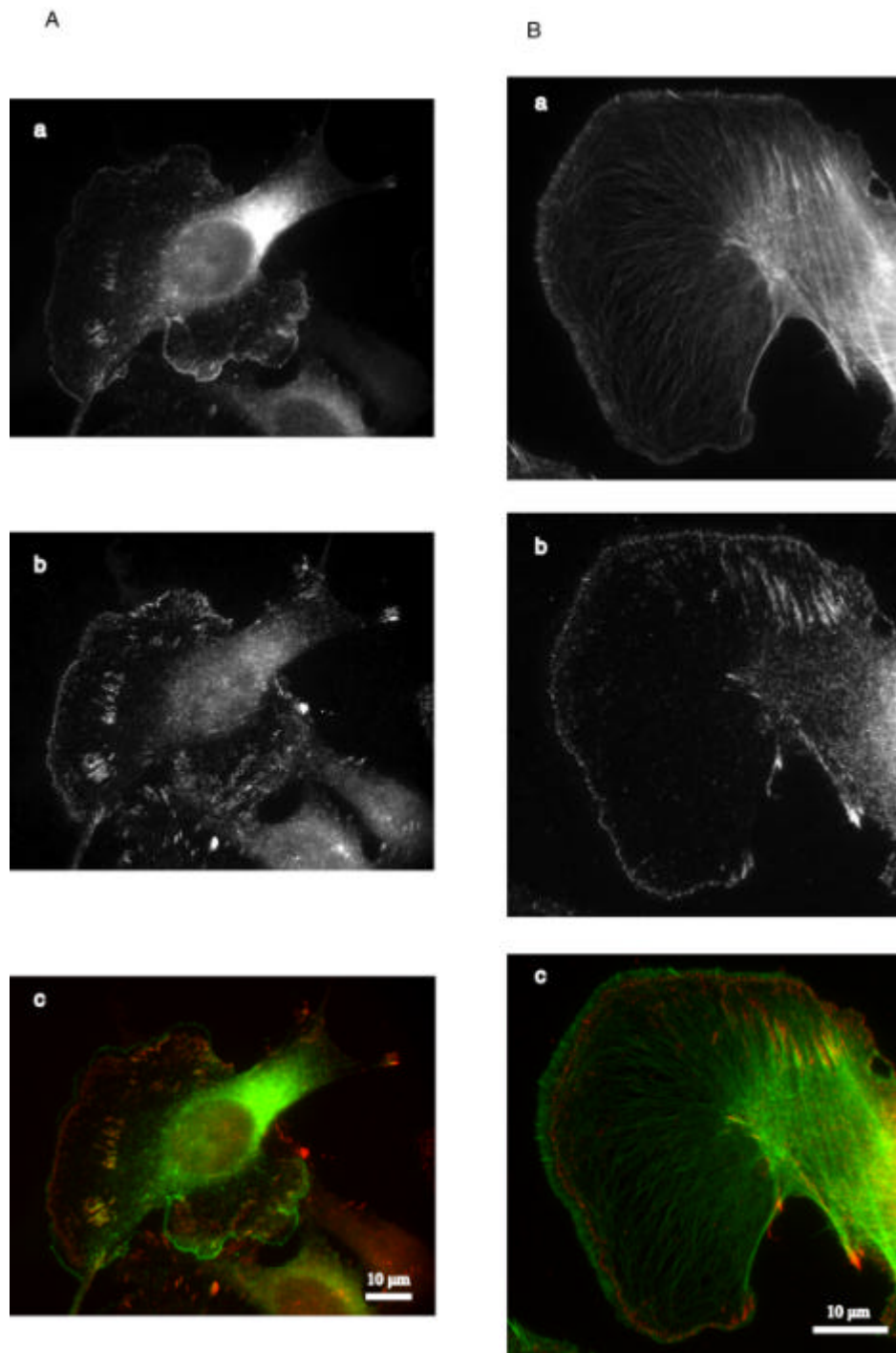


Abbildung 23: Kolokalisation in der indirekten Immunfluoreszenz von Paxillin mit GFP-VASP A) und Paxillin mit F-Aktin B) in Lammelpodien

A) GFP-VASP a) und Paxillin b) im Vergleich c); mit GFP-VASP in grün, Paxillin in rot, Kolokalisation in gelb

B) F-Aktin a) und Paxillin b) in einer Übereinanderlagerung c) der indirekten Immunfluoreszenzen mit F-Aktin in grün, Paxillin in rot, kolokalisierende Bereiche in gelb

3.3.1.1 Darstellung der Lokalisation der GFP-EVH1-Domäne von Mena in den Lamellipodien von B16F1 Zellen

Von Mena und VASP wurden funktionelle Domänen in B16F1-Zellen exprimiert. Dabei handelte es sich um die EVH1-Domäne von Mena und die G(P)5-EVH2-Domäne von VASP, die transient in den Zellen exprimiert wurden. Über digitale Videomikroskopie konnte gezeigt werden, daß die EVH1-Domäne von Mena in der Zelle nur in „focal contacts“ eingebaut wird und dort lokalisiert ist (Abbildung 24). Wie Abbildung 24 zeigt, ist die EVH1-Domäne nicht an der Führungslamelle und in Filopodien lokalisiert, sondern an den hoch dynamischen „focal contacts“, die das Lamellipodium an dem Substrat anheften. Die G(P)5- und EVH2-Domäne von VASP wird mit einem hohen zytoplasmatischen Hintergrund in den B16F1-Zellen exprimiert. Auch diese werden in den „focal contacts“ lokalisiert (nicht gezeigt).

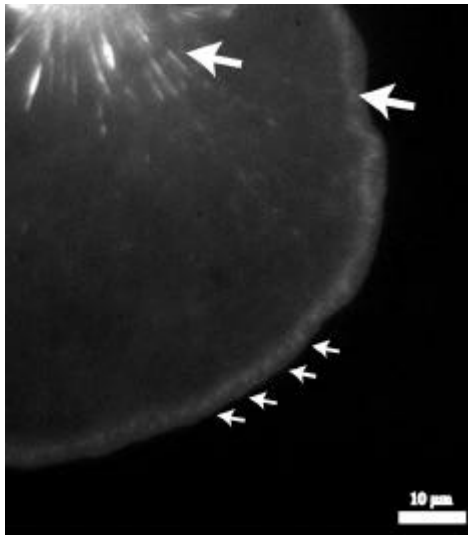


Abbildung 24: Lamellipodium einer GFP-EVH1-Mena transient exprimierenden B16F1-Zelle, große Pfeile zeigen „focal contact“ der Zelle innerhalb des Zytoplasma und des Lamellipodiums, kleine Pfeile sollen die Begrenzung des Lamellipodiums ansatzweise markieren

3.3.2 Lokalisation von GFP-Arp3 und GFP-p21-Arc Proteinen in B16F1 Zellen

Die Funktion und daher auch die Lokalisation des Arp2/3-Komplexes ist mit Aktin stark verknüpft. Jedoch ist die Dynamik des Komplexes ungeklärt. Durch den Einsatz von Antikörpern in elektronenmikroskopischen Studien (Svitkina et al. 1999 b) konnte der Komplex in den orthogonalen Verzweigungen („Y-junctions“) des Aktinnetzwerkes der Lamellipodien lokalisiert werden. Der Arp2/3-Komplex konnte in den meisten Filopodien nicht nachgewiesen werden.

Die GFP-Konstrukte p21-Arc und Arp3 wurden transient in B16F1-Zellen exprimiert und ihre Dynamik über Videomikroskopie analysiert. In Abbildung 25a und b ist die Verteilung des GFP-p21-Arc Fusionsproteins im Vergleich mit Aktin gezeigt. Die Verteilung des Fusionsproteins

entlang der Lamellipodien ist vergleichbar mit der von Aktin.

Über digitale Videofluoreszenzmikroskopie ist eine Videosequenz (Abbildung 26) aufgezeichnet worden, die eine mit GFP-p21-Arc transfizierte B16F1-Zelle darstellt, um die Dynamik dieses Proteins zu studieren. Ein expandierendes Lamellipodium und ein sich retrahierender Bereich (Pfeil) sind zu erkennen. Die Retraktion geht mit der Delokalisation von GFP-p21-Arc aus dem Lamellipodium einher. Weiter können innerhalb des Zytoplasmas schnell entstehende und sich auflösende „patches“ beobachtet werden, wie sie auch in stabil transfizierten GFP-Aktin B16F1-Zellen beschrieben wurden (Ballestrem et al. 1989). Eine vergleichende Lokalisation und Dynamik besitzt GFP-Arp3 (nicht gezeigt). Filopodien, die sich lateral innerhalb des expandierenden Lamellipodiums bewegen, konnten nicht durch die GFP-p21-Arc Proteine und GFP-Arp3 Fusionsproteine identifiziert werden.

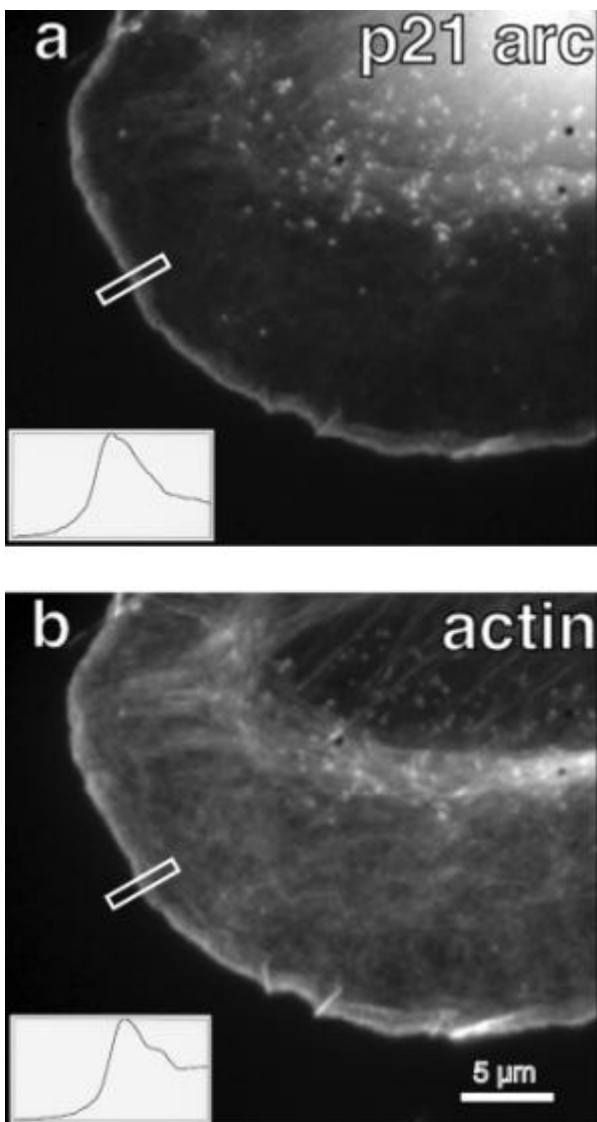


Abbildung 25: Vergleich der Verteilung von GFP-p21-Arc a) und F-Aktin b) in einem Lamellipodium von B16F1 Zellen. Messungen der Intensität der Fluorochrome ergaben eine vergleichbare Verteilung von GFP-p21-Arc und F-Aktin

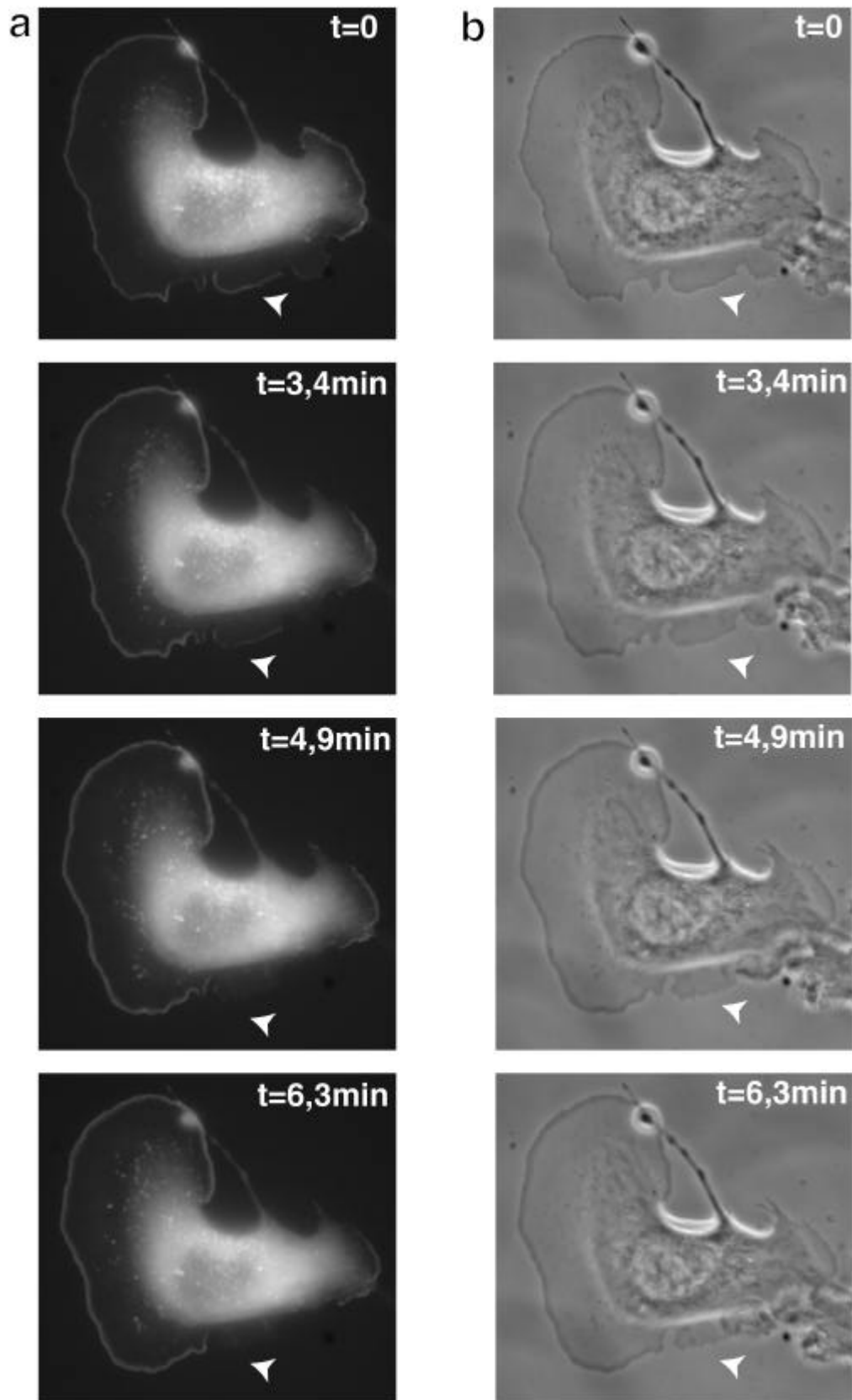


Abbildung 26: Videosequenz einer GFP-p21-Arc transient exprimierenden B16F1 Zelle a) und Phasenkontrastaufnahme b). In a) kann GFP-p21-Arc in dem expandierenden Lamellipodium und in „actin patches“ lokalisiert werden, Pfeile markieren ein retrahierendes Lamellipodium

3.3.3 Darstellung von GFP-Fusionsproteinen in mit *Listeria monocytogenes* infizierten Zellen

Die Analysen wurden sowohl in PtK2-Zellen als auch in HeLa-Zellen durchgeführt. Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf Lokalisation und Dynamik der Fusionsproteine bei der intrazellulären Bewegung der Listerien festgestellt werden. Als Negativkontrolle wurde der Vektor EGFP-N1 verwendet, um eine Rekrutierung des GFP von den intrazellulären Listerien auszuschließen (siehe Abbildung 27 a). Das Protein GFP ist innerhalb des Kerns und diffus im Zytoplasma verteilt. Bakterien (siehe Pfeil) und Zellbestandteile, wie Vesikel und Mitochondrien, heben sich dunkel vom Hintergrund ab.

Aktin

Die Expression von GFP-Aktin findet als Monomer statt, jedoch kann nur die Struktur des F-Aktins lokalisiert werden, die sich deutlich von den Monomeren in ihrer erhöhten Fluoreszenz absetzt. F-Aktin bildet u.a. den Hauptbestandteil der Streßfasern in der Zelle. Bei sich nicht bewegend und sich teilenden Bakterien (siehe Abbildung 27b Pfeil1) ist Aktin um die Listerien uniform lokalisiert, wobei erst eine Polarität an einem Pol zu erkennen ist, wenn sich die Listerien in einer späten Teilungsphase befinden und sich anschließend beginnen intrazellulär zu bewegen. In einer späteren Phase der Bewegung ist Aktin um die Listerien nicht lokalisierbar, sondern ausschließlich im Listerienschweif (siehe Abbildung 27 b Pfeil2). Das mit „2“ markierte Bakterium besitzt zu diesem Zeitpunkt der Bewegung eine Geschwindigkeit von ca. 4 $\mu\text{m}/\text{sec}$. In „protrusions“ ist Aktin ebenfalls in den Schweifen und nicht an den Bakterien lokalisiert.

Arp2/3-Komplex

Die GFP-Fusionsproteine des Arp2/3-Komplexes werden mit einem hohen zytoplasmatischen Anteil in der Zelle exprimiert. Die Abbildung 27c zeigt eine mit GFP-p21-Arc transfizierte HeLa-Zelle. Wie auch GFP-Arp3 transfizierte Zellen zeigen (nicht dargestellt), haben unbewegliche und in der Teilungsphase befindliche Listerien (Pfeil 1) die Komponenten des Arp2/3-Komplexes uniform rekrutiert. Bei Listerien, die sich intrazellulär bewegen, findet eine Umlagerung statt. Der Arp2/3 Komplex kann am posterioren Pol und in dem Schweif, aber nicht mehr um die Listerien lokalisiert werden (Pfeil 2). Die Koloalisation von Aktin und dem Arp2/3-Komplex, wie sie mit den GFP-Fusionsproteinen zu erkennen ist, konnte durch indirekte Immunfluoreszenz von DNaseI und Phalloidin gekoppeltem Fluorochromen bestätigt werden. Die beschriebene Verteilung des Arp2/3-Komplexes der hoch dynamischen „actin patches“ (Schafer et al. 1998) konnte innerhalb mit Listerien infizierten Zellen nicht beobachtet werden.

Mena und VASP

Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie wurden als GFP-Fusionsproteine in PtK2-Zellen transfiziert und können auch an den „focal contacts“ und Zell-Zell-Kontakten (siehe Abbildung 27e, Pfeil 3) lokalisiert werden. Die Lokalisation von Mena (Abbildung 27d) und VASP (Abbildung 27e) um die Bakterien ist kontinuierlich. Sich nicht bewegende (Pfeil 1) und teilende (Pfeil 2) Listerien zeigen keine ausgeprägte Polarität der Wirtszellproteine, wobei sich bewegende Bakterien eine deutliche Polarität und eine Erhöhung der GFP-Konzentration am posterioren Pol, dem Ort der Polymerisation des Aktin, aufweisen (Dädelow 1999).

Durch die digitale Videomikroskopie konnte eine interessante Darstellung der ungleichen Lokalisation von Aktin und dem Arp2/3-Komplex gegenüber der Ena/VASP-Familie während der intrazellulären Bewegung der Listerien beobachtet werden. Die in den Abbildungen 27 mit „2“ markierten Listerien haben ausgeprägte Aktinfilamentschweife und bewegen sich durch das Zytoplasma der Zelle. Während Aktin innerhalb des Schweifes stark lokalisiert werden kann (Abbildung 27b), sind die Proteine VASP und Mena nicht innerhalb des Schweifes lokalisiert, sondern am hinteren Pol des Bakteriums konzentriert, dies bestätigen auch frühere Immunfluoreszenzstudien (Carl 1998, Dädelow 1999). Außerdem wird deutlich, daß eine Umlagerung von Aktin und den Proteinen des Arp2/3-Komplexes bei der Bildung und der Dissoziation von listeriellen Schweifen stattfindet. Diese Umlagerung findet bei den Proteinen der Ena/VASP-Familie in dieser Form nicht statt, sondern äußert sich in der Form von Polarität an dem posterioren Pol bei der Bildung des Aktinschweifes.

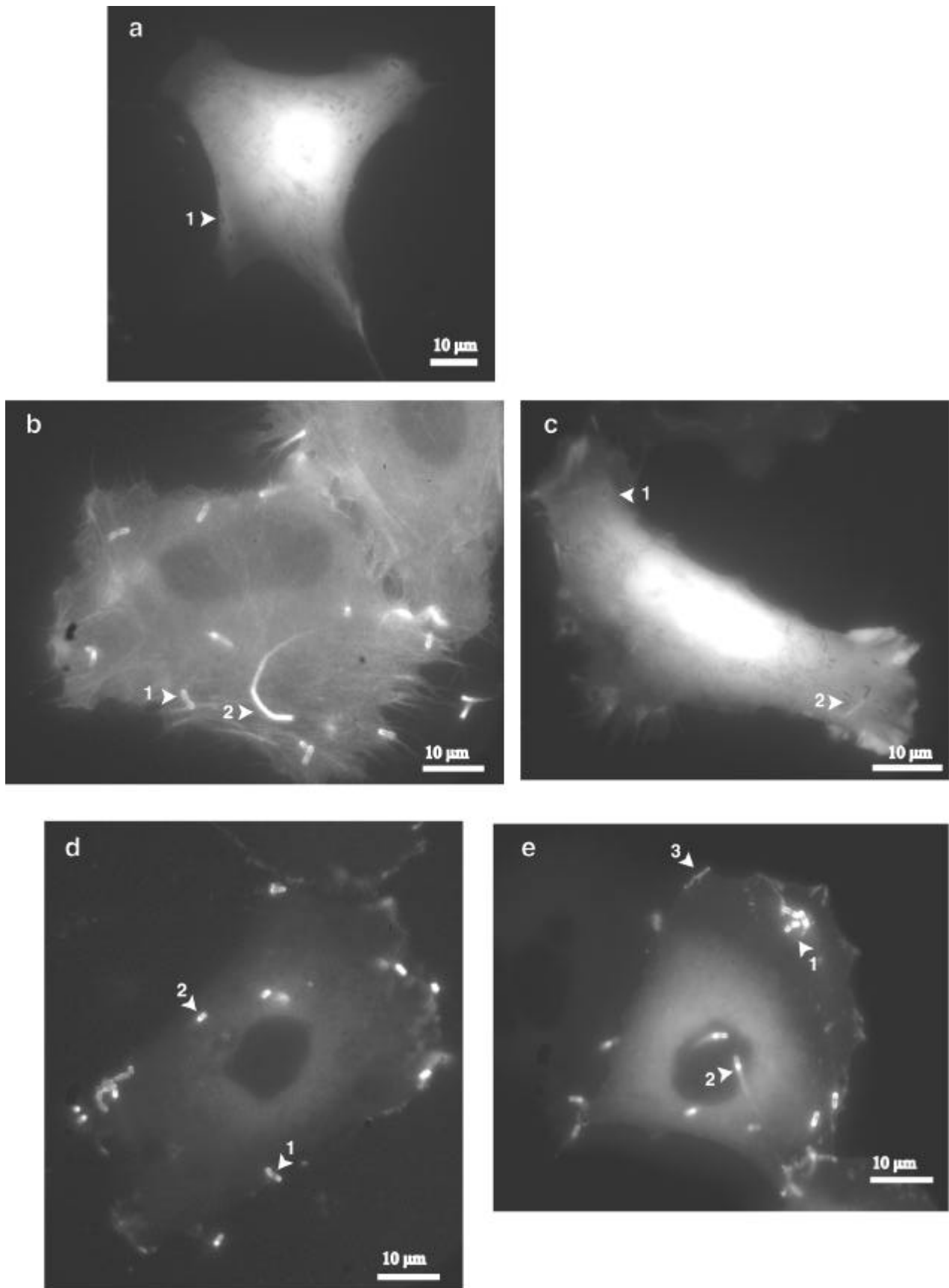


Abbildung 27: Darstellung von GFP-Fusionsproteinen in mit *Listeria monocytogenes* infizierten Zellen. In a) wurde der pEGFP-N1 Vektor, in b) pEGFP-Aktin, in c) pEGFP-p21-Arc, in d) pEGFP-Mena und in e) pEGFP-VASP verwendet.

3.3.4 Arp2/3-Komplex Rekrutierung durch intrazelluläre Listerien in Gegenwart der Aktin depolymerisierenden Substanz Latrunkulin B

Aktin und der Arp2/3-Komplex werden durch den N-Terminus von ActA rekrutiert. Eine endgültige Aussage der direkten Bindung von ActA zu Aktin oder zu einem Bestandteil des Arp2/3-Komplexes konnte derzeit noch nicht nachgewiesen werden.

Latrunkulin B, eine Aktin depolymerisierende Substanz aus *Latrunculia magnifica*, einem Schwamm aus dem Roten Meer, wirkt inhibierend auf die Aktin-Polymerisation und zerstört bestehende Aktinfilamente. Dadurch werden mikrofilamentabhängige Zellprozesse gehemmt. Es besitzt eine 10-100 fach höhere Wirksamkeit als die Substanz Cytochalasin D (Spector et al. 1989), ein fungaler Inhibitor der Aktinfilamentbildung. Transient exprimierende PtK2-Zellen mit dem Fusionsprotein GFP-p21-Arc werden mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Nach mindestens einer 1 stündigen Infektionszeit wurde mit der *in vivo* Beobachtung begonnen und zu diesem Zeitpunkt 12 µm Latrunkulin B zugesetzt. Durch digitale Videoaufnahmen von Phasenkontrast und Fluoreszenz für GFP kann zum einen gezeigt werden, daß sich die Zellform sehr schnell unter der Einwirkung von Latrunkulin B verändert. Die Zelle rundet sich ab. Jedoch kann während der gesamten Beobachtungszeit Vesikeltransport beobachtet werden, was zeigt, daß die Zelle lebt. Dieser Vesikeltransport ist abhängig von dem Mikrotubulisystem der Zelle.

Die F-Aktinschweife der Listerien werden abgebaut und die Listerien gehen in eine nicht bewegliche Phase über, welches zu Mikrokoloniebildung führt. Durch eine längere Beobachtungszeit (3-5 Stunden) konnte aus den Fluoreszenz-Videosequenzen nicht eindeutig abgeleitet werden, ob GFP-p21-Arc durch den „Bleachingeffekt“ der Quecksilberlampe oder durch die Teilung und somit die Ausdünnung des GFP-Fusionsproteins um die Listerien nicht mehr detektiert werden konnte. Die Ausdünnung des GFP-Fusionsprotein setzte voraus, daß keine neue Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes um die Listerien erfolgte.

Aus diesem Grund wurde der Versuch wiederholt und Latrunkulin B 3-4 Stunden auf den infizierten Zellen belassen, einer Zeitspanne, die der oben aufgeführten Beobachtungszeit der Videomikroskopie entsprach. Anschließend wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe Abbildung 28). Die indirekte Immunfluoreszenz mit Texas-Red konjugiertem Phalloidin (Abbildung 28a) und DNase I (Abbildung 28b) zeigt das vollständig destabilisierte Aktinzytoskelett der Zelle. Eine Gegenfärbung mit ActA spezifischen Antikörpern weist die gebildeten Mikrokolonien der Listerien innerhalb der Zellen nach (Abbildung 28a' und Abbildung 28b'). Die Darstellung von Mena (Abbildung 28c) um die Listerien zeigt, daß die Rekrutierung von Wirtszellproteinen unter der Einwirkung von Latrunkulin B stattfinden kann. Es kann jedoch nicht erkannt werden, ob eine Polarität des

Proteins Mena an den Listerien vorhanden ist, da die Bakterien in unterschiedlichen Ebenen liegen und eine Fokussierung dieser Ebenen durch die starke Intensität der fluoreszenten Streustrahlung nicht möglich war. Zu der Detektion des Arp2/3-Komplexes wurden zwei polyklonale, aufgereinigte Antikörper zum einen für die Untereinheit p21-Arc (Abbildung 28d), zum anderen für die Untereinheit p40-Arc (Abbildung 28e) verwendet. Daraus läßt sich folgern, daß zum einen die Rekrutierung der Proteine des Arp2/3-Komplexes p21-Arc und p40-Arc unter der Einwirkung der Droge Latrunkulin B stattfinden kann, zum anderen, daß die Rekrutierung des Komplexes in Abwesenheit von rekrutiertem F-Aktin vollzogen werden kann.

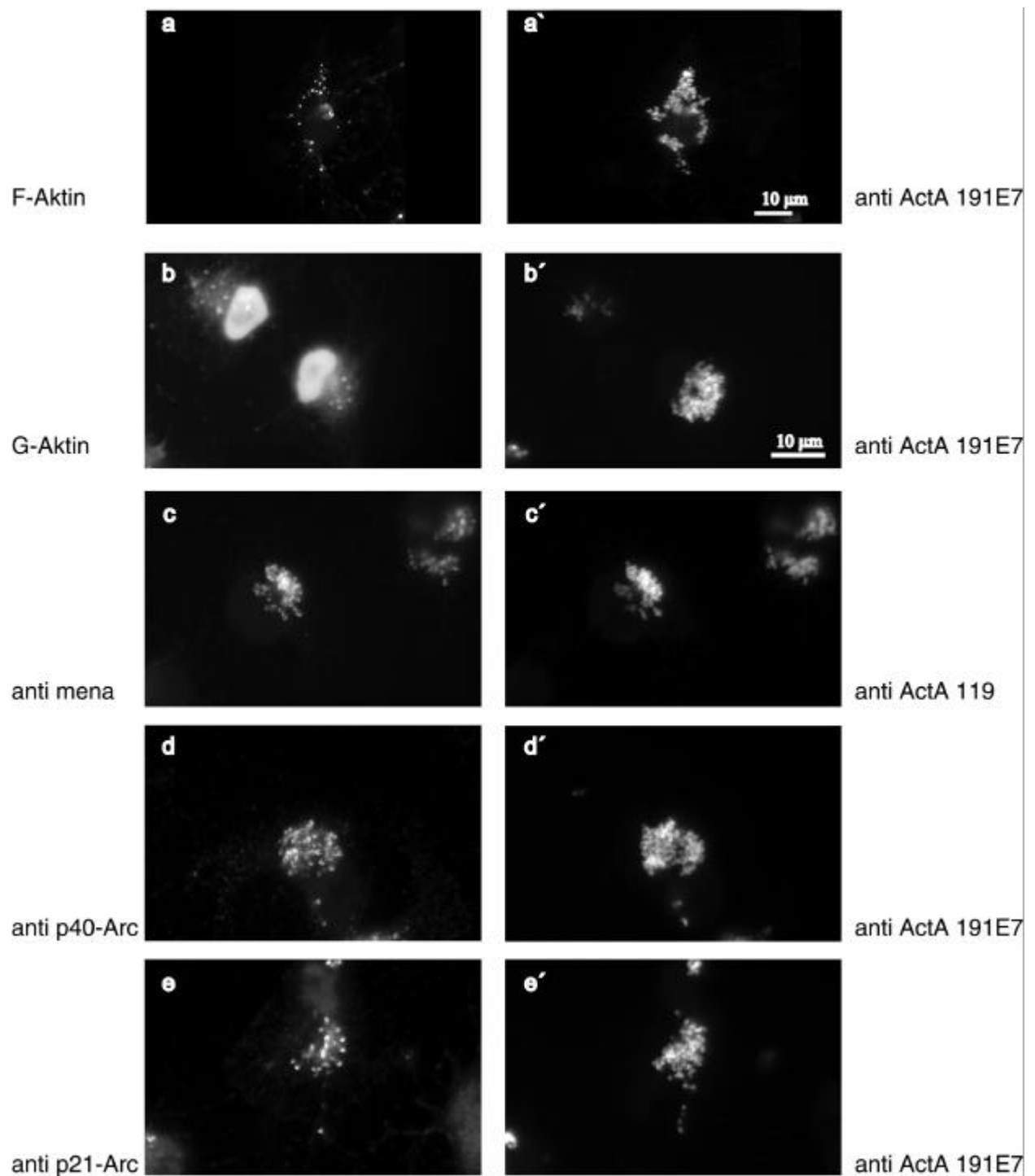


Abbildung 28: Indirekte Immunfluoreszenz von *Listeria monocytogenes* infizierten PtK2-Zellen unter der Einwirkung von 12 µm Latrunculin B 4 h nach Beginn der Infektion mit *Listeria monocytogenes* (c,c', d,d', e,e' entsprechen der Größendarstellung von b,b')

4. Diskussion

Der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten ist entscheidend für die Bewegung von Zellen innerhalb des Organismus, wie sie in der Immunantwort, der Embryogenese oder in der Metastasierung von Krebszellen auftreten. Diese Vorgänge sind weitgehend unverstanden. Es fehlt die genaue Kenntnis, welche Proteine in der Aktindynamik und den daran beteiligten Signalkaskaden innerhalb der Zelle involviert sind.

Als intrazelluläre, bakterielle Pathogene stellen Listerien und Shigellen ein inzwischen etabliertes Modellsystem zur Aufklärung von molekularen Mechanismen der Aktindynamik tierischer Zellen dar. Beide Erreger präsentieren auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Proteine, welche durch die Aktinrekrutierung die Bewegung der Bakterien innerhalb der Wirtszelle ermöglichen. Jede Bakterienart hat eine Möglichkeit gefunden, die für die Aktinnukleation notwendigen zellulären Proteine der eukaryonten Wirtszelle für sich zu nutzen. Das bakterielle Protein ActA zum Beispiel, das für die intrazelluläre Bewegung der Listerien verantwortlich ist, muß insbesondere die folgenden Funktionen erfüllen:

1. ActA muß Wirtszellproteine nachahmen, die die Zelle normalerweise für die Aktinnukleation und -polymerisation benötigt.
2. Das bakterielle System der Proteinrekrutierung muß effektiver sein als das der Wirtszelle.
3. Das bakterielle System sollte von zellulären Faktoren, wie beispielsweise Komponenten der Signalkaskade, nicht beeinflussbar sein (Ebel et al.1999).

Die Charakterisierung des ActA Moleküls ermöglicht weiterhin Proteine zu finden, die in ihrer Funktion und Beteiligung an der Aktinfilamentdynamik der Zelle noch unbekannt sind.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien einwirkende Antikörper gegen ActA eingesetzt, die zur Auffindung von ActA ähnlichen Proteinen in der Zelle führen sollten.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden GFP-Fusionsproteine in dem listeriellen Modellsystem und in dynamischen Zellen untersucht und in ihrer Lokalisation in den unterschiedlichen Systemen verglichen. Zusätzlich wurden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen GFP hergestellt, die ein wertvolles Werkzeug in elektronenmikroskopischen Studien und in der Analyse von GFP-Fusionsproteinen darstellen.

4.1 Funktionelle Untersuchungen des N-Terminus des ActA Proteins

Für den zentralen Bereich des ActA Proteins, die prolinreiche Region, wurden eukaryontische Bindungspartner identifiziert (Chakraborty et al. 1995), worauf eine detaillierte Charakterisierung dieser Domäne in den folgenden Jahren folgte (Niebuhr et al. 1997b, Carl et al. 1999). Dem N-Terminus von ActA konnte die Funktion der Rekrutierung von Aktinfilamenten zugeordnet werden (Pistor et al. 1994, Pistor et al. 1995, Lasa et al. 1995). Es zeigte sich, daß eine positiv geladene Region, die die Aminosäuren 146-150 beinhaltet, eine essentielle Bedeutung für die Nukleation von Aktinfilamenten und somit für die intrazelluläre Listerienbewegung hat. Während Lasa et al. (1997) durch die Deletion dieser Aminosäureregion 146-150 (T-Region) noch eine verminderte Rekrutierung von Aktinfilamenten dokumentierten, zeigte unsere Arbeitsgruppe kürzlich (Pistor et al. 2000), daß eine Punktmutation der Aminosäure 149 von Arginin zu Lysin eine Rekrutierung von Aktin verhindert. Die Ergebnisse und Interpretationen beider Gruppen stimmen darin überein, daß dieser Bereich für die Nukleation von Aktinfilamenten essentiell ist.

Des Weiteren wurde einer anderen Domäne aktinbindende Eigenschaften zugeordnet (Lasa et al. 1997), welche kontrovers diskutiert wird. Anhand eines „alignment“ des N-Terminus zwischen dem ActA Protein von *Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii* wurden homologe Bereiche gefunden, denen auf Grund der Homologie gleiche Funktionen der Aktinrekrutierung zugeordnet werden. Komplementierte Deletionsmutanten des ActA Proteins ohne die Aminosäuren 50-126 zeigten in zellfreiem System mit *Xenopus* Oocyten-Extrakten, daß diese Listerien diskontinuierliche Schweife ausbildeten d.h. keine kontinuierliche Aktinfilamentelongation besaßen (Lasa et al. 1997). Diese Region (C-Region) des ActA Proteins wurde für die Kontinuität der Aktinfilamentausbildung der Listerien verantwortlich gemacht. Die Hypothese wurde dadurch bestätigt, daß eine Aktinfilamentsedimentation mit synthetischen Peptiden aus dem N-terminalen Aminosäurebereich 62-103 gezeigt werden konnte. Demgegenüber konnte in Infektionsversuchen mit chromosomalen Deletionsmutanten, denen der Aminosäurebereiche 68-109 bzw. 90-109 von ActA fehlten, eine Verminderung der Anzahl der Aktin rekrutierten Listerien festgestellt werden (Pistor et al. 2000). Im Vergleich zu EGD wt Listerien hatten nur etwa ein Drittel der Listerien Aktin akkumuliert. Die ActA Deletionsmutante des Aminosäurebereiches 68-109 bildete nur etwa halb so viele Aktinfilamentschweife aus wie der EGD wt Stamm. Zusammenfassend kann auf Grund dieser Ergebnisse festgestellt werden, daß ein Einfluß des N-terminalen Bereiches der Aminosäuren 68-109 auf die Aktinfilamentbildung eindeutig vorhanden ist. Lasa et al. (1997) sieht den Einfluß dieser Region in der Kontinuität der Aktinfilamentelongation. Pistor et al. (2000) beschreibt den primären Einfluß auf die Nukleation von Aktin an die Listerien.

Die von K. Niebuhr und in dieser Arbeit hergestellten, monoklonalen und polyklonalen Antikörper wurden gegen natives ActA selektiert, um die beiden oben beschriebenen Regionen (AS 78-109 und AS 146-150) in Mikroinjektionsversuchen in infizierten Zellen untersuchen zu können. Die Mikroinjektion der Antikörper, die in dem Aminosäurebereich 78-104 binden, zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien, obwohl die linearen Epitope sehr dicht beieinander liegen (Überblick siehe Abbildung 6). Die Epitope liegen innerhalb der von Lasa et al. (1997) definierten G-Region (AS 50-126) und der postulierten Aktinfilament-bindenden Domäne (AS 62-103).

Die Injektion der monoklonalen Antikörper 191E7/358C1, die sowohl vor wie auch während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* injiziert wurden, bewirkte eine sofortige Inhibierung der aktinvermittelten Bewegung der Listerien. Dies führte zu der Bildung von Mikrokolonien innerhalb des Zytoplasmas. Die Listerien sind jedoch in der Lage über ActA die bekannten N-terminal bindenden Wirtszellproteine zu rekrutieren. Durch die Injektion der aufgereinigten, polyklonalen Antikörper 119 (AS 79-104) konnte keine eindeutige Inhibierung der Interaktion von ActA mit Aktin oder dem Arp2/3-Komplex festgestellt werden. Daher ist ein Einfluß dieses Bereiches auf die direkte Rekrutierung von Aktinfilamenten auszuschließen.

Listerien können sich nur intrazellulär fortbewegen, wenn die Aktinfilamentbildung auf der Listerienoberfläche polar erfolgt. Inhibieren die Antikörper die Ausbildung der Polarität, ist die Konsequenz, daß die Listerien sich nicht mehr fortbewegen können und Mikrokolonien in den infizierten Zellen ausbilden. Die Frage der Ausbildung der Polarität der Aktinfilamente bei Listerien ist bisher nicht geklärt, sondern wird noch diskutiert:

- zum einen als polare Sekretion des listeriellen Proteins ActA (Kocks et al. 1993),
- zum anderen die uniforme Verteilung von ActA auf der Listerienoberfläche (Niebuhr et al. 1993, Niebuhr 1994, Dädelow 1999), die gegen eine polare Sekretion spricht.

Diese unterschiedlichen Resultate können auf die Verwendung unterschiedlicher Listerienstämme zurückgeführt werden. Die Theorie der Polaritätsausbildung von Kocks et al. (1993) weist auf die diskontinuierliche Verteilung von ActA während der Teilung hin, wobei ActA innerhalb der Teilungsebene nicht detektiert werden kann. Demgegenüber zeigt die Verteilung von Aktin um Bakterien der späteren Teilungsphase oder um einzelne Bakterien, daß dort eine uniforme Verteilung stattfindet. Außerdem sind Listerien in der Lage, auch ohne Teilung die intrazelluläre Bewegung erneut aufzunehmen.

Die Mikroinjektion des ActA Antikörpers 349D4, der die lineare Aminosäuresequenz 92-97 erkennt und somit unmittelbar an das Epitop des ActA Antikörpers 191E7 anschließt, bewirkt eine Verlangsamung der Bakteriengeschwindigkeit um ca. 20% gegenüber der Geschwindigkeit vor der Injektion. Dieser Phänotyp -Verlangsamung der Geschwindigkeit intrazellulärer Listerien- konnte bei einer Deletion der prolinreichen Region (Δ ActA5-Mutante) beobachtet werden (Niebuhr et al. 1997b). Dieser Region wurde daraufhin eine Effektorfunktion in der Aktinfilamentbildung zugeordnet. Abgeleitet von dem intrazellulären Phänotyp der Δ ActA5-Mutante ist daher anzunehmen, daß das analysierte Motiv (AS 84-97) eine weitere effektorische Domäne in dem listeriellen System darstellt, die zu einer optimalen Nutzung der Aktindynamik führt und gegenüber der Wirtszelle Vorteile verschafft.

Die injizierten Peptidantikörper, deren Epitop in dem ActA Aminosäurebereich 141-171 liegen (Übersicht siehe Tabelle 8), zeigten keinen Einfluß auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien. Die Antikörper binden nicht direkt das positiv geladene „cluster“ AS 146-150, sondern erkennen benachbarte Sequenzen. Diese Antikörper konnten durch ihre Bindung an ActA nicht verhindern, daß die Aktinfilamentbildung erfolgt. Es fand keine sterische Hinderung gegenüber zellulären Proteinen statt.

Für die Herstellung der Antikörper gegen ActA wurden sowohl natives ActA, als auch synthetische ActA Peptide eingesetzt. Das „Screenen“ der generierten Antikörper wurde primär im ELISA mit nativem ActA durchgeführt, so daß nur auf der Oberfläche von ActA exponierte Epitope erkannt werden. Gegen den Aminosäurebereich 84-92 von ActA wurden drei unterschiedliche Antikörper selektiert, was zeigt, daß dieser Bereich offensichtlich zellulären Bindungspartnern zugänglich ist.

Die Tertiärstruktur von ActA ist bisher unbekannt und zur Zeit wird versucht, diese mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären, um Hinweise auf die Konformation und strukturelle Funktionsweise von ActA zu bekommen.

Es besteht die Hypothese, daß die Konformation des N-Terminus von ActA erhalten bleiben muß, damit die „Aktinpolymerisationsmechanismus“ der Zelle für die intrazelluläre Bewegung eingesetzt werden kann. ActA wurde von Mourrain et al. (1997) durch das Zwei-Hybridsystem in Hefe und durch „crosslinking“-Experimente als ein Dimer identifiziert. Die Dimerisierungsdomäne konnte den Aminosäuren 126-155 zugeordnet werden. Die Bindung der Antikörper könnte eine sterische Hinderung erzeugen, auf Grund dessen keine Dimerisierung erfolgen kann. Nach der Hypothese von Mourrain et al. (1997) kann somit auch keine Elongation

der F-Aktinfilamente stattfinden, bei der jeweils zwei C-Regionen ein Aktinmolekül binden würden. Die Listerien rekrutieren zwar Aktin und Proteine, die für die Nukleation benötigt werden, können jedoch den Aktinfilamentschweif nicht ausbilden. Kürzlich erhaltene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe widerlegten die Hypothese, daß ActA als Dimer agiert (persönliche Mitteilung D.Heinz). Da durch analytische Ultrazentrifugation von aufgereinigtem ActA, mit der die Sedimentationsgeschwindigkeit von Proteinen gemessen wird, keine Dimerisierung von ActA nachgewiesen werden konnte, kann die oben dargestellte These der Dimerisierung von Mourrain et al. (1997) in Frage gestellt werden.

Eine andere Hypothese des Wirkungsmechanismus von ActA bezieht sich auf den Vergleich zwischen dem Zytoskelettprotein Vinculin und ActA. Das „focal contact“ Protein Vinculin besitzt zwischen den Aminosäuren 878-1066 eine Aktinbindungsdomäne, die verglichen mit den N-terminalen Aminosäuren von ActA 41 bis 264 eine 25%ige Übereinstimmung besitzt. Daraus wird die Schlußfolgerung gezogen, das ActA in diesem Bereich, ähnlich wie die Aminosäuresequenz von Vinculin, geschützt ist und in dem Aminosäurebereich 62-103 eine verborgene Aktinbindungsdomäne besitzt (Lasa et al. 1997, Lasa et al. 1998).

Eine weitere Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse könnte die durch Konkurrenz der Antikörper oder Blockierung der Bindungsstelle hervorgerufene Abwesenheit eines unbekannten zellulären Faktors sein, der entweder ActA selbst modifiziert und somit die aktinvermittelte Bewegung startet und/oder für die Elongation des F-Aktin notwendig ist.

Die Injektion der monoklonalen ActA Peptidantikörper gegen den Aminosäurebereich 141-171 zeigte keine Beeinflussung der F-Aktinschweifbildung, obwohl das „KKRRK“-Motiv (AS 146-150) innerhalb dieses Bereiches von ActA eine WASP-analoge Funktion bezüglich der Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes zugeschrieben wird (Machesky and Insall 1998, May et al. 1999, Pistor et al. 2000). Mittels ELISA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß eine Kreuzreaktion der ActA Peptidantikörper und SCAR1, einem Mitglied der WASP-Proteinfamilie, stattfindet. Während die Peptidantikörper 87C9 und 250F4 den Bereich SCAR-W von den Aminosäuren 443-547 erkennen, kreuzreagiert der Peptidantikörper 282E1 mit der SCAR-A Domäne. Diese Ergebnisse können auch durch die Ermittlung der linearen Epitope (siehe Tabelle 7) bestätigt werden. Die Peptidantikörper 87C9, 250F4 und 282E1 wurden in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 4 mg/ml injiziert, einer 8fach höheren Konzentration als die Antikörper 191E7/358C1 oder 349D4. Es konnte trotzdem keine Beeinflussung der Aktinfilamentbildung um die intrazellulären Listerien festgestellt werden.

Der Aminosäurebereich 146-150 wird als Bindungsstelle für den Arp2/3-Komplex diskutiert und

hierdurch soll die Rekrutierung von G-Aktin für die Nukleation erfolgen. Daher wäre es möglich, daß die Antikörper durch ihre Dissoziation und die Menge an Zytoskelettmolekülen (G-Aktin und Arp2/3-Komplexproteine), die an diese Stelle rekrutiert werden, verdrängt werden. Außerdem ist nicht bekannt, welche Affinität die Peptidantikörper gegen ActA besitzen.

Trotz der bisherigen Arbeiten muß noch eine detaillierte Analyse der Aktinfilamentbildung, die durch ActA „katalysiert“ wird, geleistet werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die funktionell wirksamen Antikörper 191E7/358C1 und 349D4 einen Einfluß auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien besitzen. Die Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit den veröffentlichten Resultaten der Gruppen von P. Cossart (Lasa et al. 1997) und unserer eigenen (Pistor et al. 2000) läßt den allgemeinen Schluß zu, daß die Region der Aminosäuren 74-104 eine weitere Effektorfunktion in der Aktinfilamentbildung besitzt.

4.2 Identifizierung des prp48 Proteins als neues ActA Analoga

Die Mikroinjektion der ActA Antikörper 191E7/358C1 und 349D4 zeigte, daß diese eine inhibitorische Wirkung auf die intrazelluläre Bewegung der Listerien ausüben. Dieser Effekt beruht sicherlich nicht auf der Behinderung der Interaktion zwischen bekannten N-terminal ActA bindenden Wirtszellproteinen, wie dem Arp2/3-Komplex, G- und F-Aktin, da trotz der Gegenwart bzw. Bindung der Antikörper an ActA die zellulären Proteine auf der Listerienoberfläche lokalisierbar sind.

Zusätzlich zu den inhibitorischen Effekten auf die intrazelluläre, listerielle Bewegung durch die ActA Antikörper (191E7/358C1 und 349D4) zeigten diese eine übereinstimmende Lokalisation von „focal contact“ Proteinen in der indirekten Immunfluoreszenz auf nicht infizierten humanen Zellen (siehe Ergebnisse Abbildung 11). Diese Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper beruht auf der Erkennung von ähnlichen Aminosäuresequenzen. Für die ActA Antikörper 191E7 und 349D4 konnten lineare Epitope in ActA identifiziert werden. Die Methode, Antikörper mit definierten Epitopen zu nutzen, um neue eukaryote, analoge Proteine zu finden, wurde schon vorher in der Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt. Mit Antikörpern, die gegen die prolinreiche Region von ActA gerichtet sind, wurde eine cDNA Maus Expressionsbank „gescreent“, um neue Bindungspartner für die EVH1-Domäne zu finden (Krause 1999, Krause et al. 2000). Von diesen Antikörpern war bekannt, daß sie die prolinreichen Motive der Zytoskelettproteine Vinculin und Zyxin erkennen, so daß die Suche nach weiteren Analoga und deren Charakterisierung durch die Bindung an die EVH1-Domäne sinnvoll war. Das nach diesem Verfahren identifizierte ActA

analoge Protein wurde als Fyb/SLAP identifiziert (Krause 1999). In dem in dieser Arbeit eingesetzten „screening“ Verfahren konnte keine funktionelle Analyse angeschlossen werden. Das ActA analoge Protein prp48 wurde auf Grund der Kreuzreaktion der Antikörper 191E7 und der Lokalisation in „focal contacts“ selektiert.

Insgesamt wurden drei zelluläre Proteine als mögliche ActA analoge Proteine durch die Antikörper identifiziert.

Das Ran binding protein-1 (Ranbp1) wurde durch den Antikörper 349D4 identifiziert. Die Proteinlänge von 201 Aminosäuren entspricht einer Größe von ca. 22kDa. Die Funktion des Proteins liegt in der Inhibierung des GTP Austausches des Ran Proteins durch die Bildung eines Trimerkomplexes, der Ran, GTP und das Ranbp-1 enthält. Es wird vermutet, daß das Ranbp-1 an dem intrazellulären Signalweg beteiligt ist, der den Transport von Proteinen und Nukleinsäuren durch die Kernmembran bestimmt und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Zum einen konnte keine Ähnlichkeit des linearen Epitops von ActA innerhalb des Ranbp-1 entdeckt werden, zum anderen lokalisiert es nicht in „focal contacts“.

Mit dem ActA Antikörper 191E7 konnten zwei Proteine in der Expressionsbank identifiziert werden. Zum einen die ebenfalls an dem Kerntransport beteiligte β -Importin Untereinheit und zum anderen das in seiner primären Aminosäuresequenz teilweise bekannte „proline rich protein 48“ (prp48). Die primäre Aminosäuresequenz der Untereinheit β -Importin konnte nicht mit dem linearen Epitop des ActA Antikörpers in Übereinstimmung gebracht werden. Auch die Funktion des Proteins, an dem Kerntransport von Proteinen beteiligt zu sein, entsprach nicht der Lokalisation in „focal contacts“.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Ranbp-1 und die β -Importin Untereinheit von den ActA Antikörpern aufgrund ihrer dreidimensionalen Proteinstruktur erkannt werden. Die oben beschriebenen Auswahlkriterien, die auf Western Blot Analyse und Immunfluoreszenz-lokalisierung von „focal contacts“ basieren, treffen nicht auf diese Proteine zu und die Analyse wurde zunächst zurückgestellt.

Das dritte identifizierte Protein, das prp48, wies eine Übereinstimmung in der primären Aminosäuresequenz mit dem linearen Epitop des ActAs auf. Durch das GFP-Fusionsprotein prp48 konnte eine Lokalisation in „focal contacts“ gezeigt werden. Damit sind die oben genannten Kriterien des gesuchten ActA analogen Proteins erfüllt. Eine Funktionalität des analogen Motivs konnte bisher auf Grund der Komplexität nicht gezeigt werden.

Das in dieser Arbeit als ActA analog identifizierte Protein prp48 wurde in Form einer Teilsequenz aus der Maus als ein Bindungspartner des neuronalen Proteins FE65 veröffentlicht

(Ermekova et al. 1997). Das als Adapterprotein fungierende FE65 interagiert *in vivo* mit dem „ β -Amyloid Precursor“ Protein, welches eine Schlüsselrolle in der Alzheimer Krankheit einnimmt (Überblick unter Watson 1993). Die WW-Domäne des FE65-Proteins kann an die prolinreichen-Regionen des prp48 Proteins mit einer relativ geringen Affinität binden. WW-Domänen sind kleine globuläre Module mit der Größe von 38-40 Aminosäuren. Der Name beruht auf zwei konservierten Tryptophanresten, die in einem definierten Abstand von 20-22 Aminosäuren vorliegen und eine wichtige Rolle in der Struktur und Funktion der WW-Domäne spielen (Bork et al. 1994). Mittlerweile werden vier Klassen von WW-Domänen postuliert, die sich hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber Peptidliganden unterscheiden (Übersicht siehe Kay et al. 2000). Das Protein FE65 fällt in die Klassifikation II, die das Ligandenmotiv PPPPPPL/R erkennt.

Ermekova und Mitarbeiter stellten über Northern Blot Analyse fest, daß die exprimierte mRNA von m prp48 in Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden exprimiert wird (Ermekova et al. 1997). Durch Strukturvergleich wurde das Protein m prp48 der Familie der Grb7/10/14 Adapter Familie zugeordnet. Die Familie setzt sich aus den Proteinen GRB7, GRB10, GRB14, MIG-10 und m prp48 zusammen. Diesen Proteinen ist eine strukturelle Domänenorganisation gemeinsam, die sich auf eine prolinreiche Region, eine RA- (RalGEF/AF6 oder Ras-assoziiert) und eine PH-Domäne bezieht (Wojcik et al. 1999). Letztere Arbeit setzt sich mit der Identifizierung der RA-Domäne über die Proteinstruktur auseinander, die über Sequenzanalyse zu der Bande 4.1/JEF Domäne zugeordnet wurde. Allgemein sind RA-Domänen in einer Vielzahl von Proteinen vertreten, wobei die meisten davon als RAS-GTP Effektoren beschrieben werden.

Proteinbereiche werden auf Grund ihrer Homologie zu Pleckstin, das in Thrombozyten das Hauptsubstrat der Proteinkinase C ist, zu PH-Domänen (Pleckstrin homology) zusammenfassend klassifiziert (Übersicht in Krauss 1997). Derartige Module sind in vielen Proteinen zu finden, deren Adapterfunktion auf Protein-Protein oder Protein-Lipid Interaktionen beruhen. Dieses Strukturmotiv umfaßt ca. 100 Aminosäuren und kommt in vielen Signalmolekülen vor, wie z.B. Serin/Threonin spezifischen Proteinkinasen. PH-Domänen können spezifische Verankerungsfunktionen an Membranen wahrnehmen, wobei Phospholipide der Membran als Bindungssubstrat postuliert werden (Übersicht in Krauss 1997).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der ActA Antikörper 191E7 die postulierte analoge lineare Aminosäuresequenz von mprp 48 erkennt (siehe Ergebnisteil Abbildung 13). Dieses lineare Motiv ist in allen drei prp48 Proteinen konserviert, wie aus der „alignment“-

Abbildung 18 zu ersehen ist. Durch eigene Datenbankrecherche in „FASTA swiss prot“ konnten die Proteine MIG-10 aus *C.elegans* und die humanen Proteine GRP7, GRP10 und GRP14 mit der höchsten Homologie identifiziert werden, wie es auch Wojcik et al. 1999 unter einer anderen Fragestellung, nämlich der Zuordnung der RA-Domäne, beschrieben hatte. Der Sequenzvergleich der ActA Aminosäuren 86-99, die die analogen Aminosäuren zwischen ActA und prp48 beinhaltet, zeigte eine Homologie zwischen prp48 und dem MIG-10 Protein von *C.elegans* (siehe Abbildung 29).

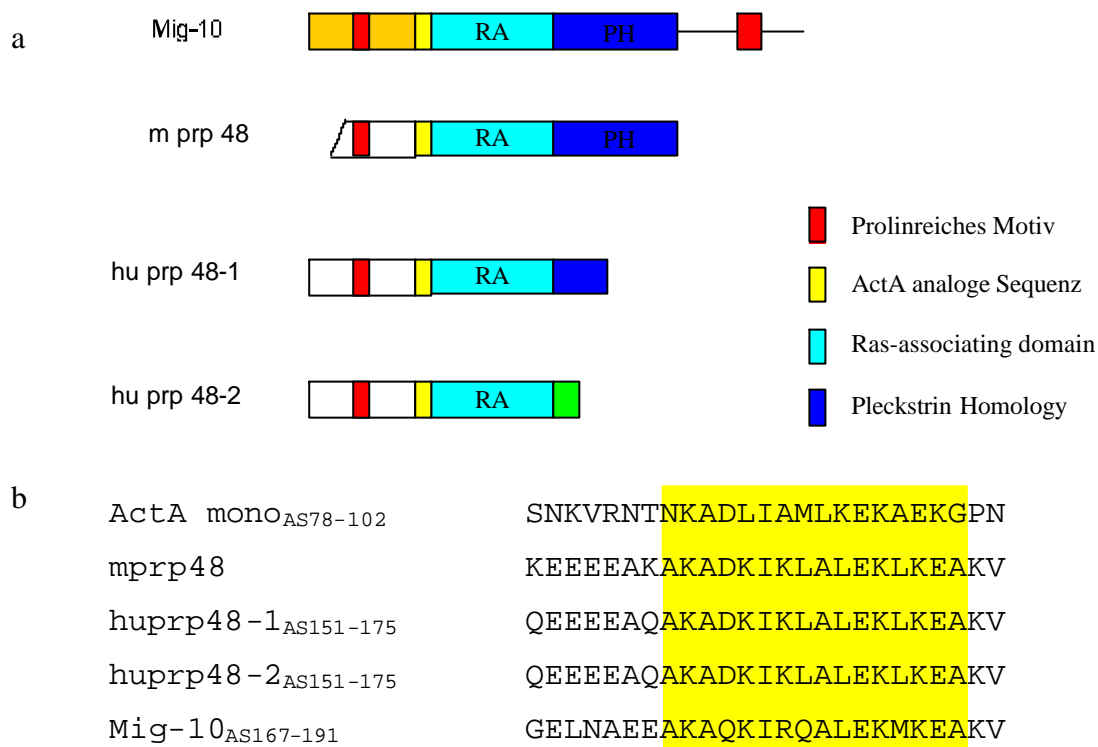


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Domänen der Proteine MIG-10 und prp48 nach Wojcik et al. 1997 in a). In b) ist die Sequenzanalogie zwischen ActA und den eukaryonten Proteinen dargestellt.

Das m prp48 Protein wird als ein Adapterprotein auf Grund der postulierten Domänen (Wojcik et al. 1999) klassifiziert. Die Familie der prp48-Proteine zeigt eine sehr starke Homologie in dem N-terminalen Bereich, die sich auf die Aminosäurebezeichnung des humanen Protein prp48-1 Aminosäure 1-262 bezieht. Die in Wojcik et al. (1999) beschriebene PH-Domäne findet sich in dem m prp48 Protein und zum Teil in dem humanen prp48-1 Protein aus HeLa-Zellen wieder. Das Protein prp48-2, welches aus humanen Adipozyten gewonnen wurde, besitzt in dieser Region keine Homologie und weist somit keine PH-Domäne auf. Daher kann angenommen werden, daß es sich um eine Spliceform handelt.

Das m prp48-Protein ist in seinem prolinreichen Bereich durch zwei dicht hintereinander

folgende, prolinreiche Motive gekennzeichnet. In dieser Arbeit konnte über das *in vitro* Experiment (siehe Abbildung 19) gezeigt werden, daß die EVH1-Domäne von Mena nach Inkubation des GST-Fusionsproteins mit dem Peptidscan des m prp48-Proteins nachweisbar ist und somit eine Bindung stattgefunden hat. Das GFP-Fusionsprotein des hu prp48-1, welches in REF-52 Zellen transfiziert und exprimiert wurde, konnte in „focal contacts“ lokalisiert werden (Abbildung 17). Diese Lokalisation könnte über die Interaktion mit Mena hergestellt werden.

Prolinreiche Motive in Proteinen sind als Bindungsdomänen weit verbreitet. So binden SH3-, WW- und die EVH1-Domänen besitzende Proteine an prolinreiche Motive (Übersicht unter Kay et al. 2000).

Niebuhr et al. (1997b) zeigten durch die Inkubation von radioaktiv markiertem VASP und Mena die Bindungseigenschaften und Bindungsunterschiede dieser Proteine auf. Dazu benutzten sie immobilisierte Peptide aus unterschiedlichen Zytoskelettproteinen, die eine prolinreiche Sequenz enthalten. Für die Bindung von EVH1 Bindungsmotiven an ihre Liganden sind drei Prinzipien von Niebuhr et al. festgelegt worden:

1. das Vorhandensein des polyprolinreichen Motivs;
2. eine aromatische, unmittelbar vor dem prolinreichen Motiv, N-terminal liegende Aminosäure;
3. das Motiv flankierende saure Aminosäurereste.

Entgegen diesen allgemeinen Prinzipien der Bindungspartner für die EVH1-Domäne besitzt das Bindungsmotiv des prp48 nicht die postulierte, aromatische Aminosäure sondern die Aminosäure Leucin. Niebuhr et al. (1997b) diskutieren, ob der Austausch von Phenylalanin zu Leucin zu einer Bindung an Mena führen kann. Die Konsensussequenz für Liganden der EVH1-Domäne wurde von Sudol (1998) als (D/E)(F/W/LPPPP) zusammengefaßt. Diese allgemeingültige Sequenz, welche von EVH1-Mena Domäne erkannt wird, trifft auf die prolinreichen Motive des m prp48 zweifach zu:

DVSHHEEALPPPPVEPMLDLLPPPPPPPELLSKEEE

Sowohl von Niebuhr et al. (1997b) als auch von Sudol (1998) wird diskutiert, ob bei der Bindung von Domänen an ihre Liganden diese Variationsbreite hinsichtlich des aromatischen Restes vorhanden ist. So ist die Bindung zwischen der EVH1-Domäne und dem prolinreichen Motiv von der Übereinstimmung der Konformation des Liganden und des Bindungspartners,

sowie von der Konzentration der Liganden, die in Konkurrenz zu der Bindung des Bindungspartners stehen, abhängig. Basierend auf diesen theoretischen und praktischen Ergebnissen würde prp48 folglich in Konkurrenz mit anderen Bindungspartnern der EVH1-Domäne wie Zyxin und Vinculin stehen.

Von Ermekova et al. (1997) wurde bei der Identifikation des Proteins m prp48 als Bindungspartner der WW-Domäne von FE65 über immobilisierte Peptide gezeigt, daß das Bindungsmotiv des m prp48 mit dem Protein FE65 der Sequenz VEPMLDLLPPPPPPPP entspricht. Die Sequenz liegt in der in dieser Arbeit gezeigten EVH1-Mena Bindungsstelle. Diese *in vitro* Daten lassen eine Konkurrenz in der Bindung zu den prp48 Proteinen erwarten. Diese Folgerung muß jedoch durch weitere *in vitro* und *in vivo* Studien belegt werden.

4.3 Untersuchung zur Lokalisation und Dynamik von GFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen

Mikrotubuli und Aktinmikrofilamente sowie die zahlreichen assoziierten Proteine dieser Systeme sind für eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben bei zellulären und subzellulären Bewegungsvorgängen verantwortlich. Das Wissen über die Wirkungsweise der Proteine setzte sich hauptsächlich aus *in vitro* Daten mit gereinigten Proteinen oder *in vivo* Daten durch indirekte Immunfluoreszenz, die eine momentane Situation innerhalb der Zelle zeigen, zusammen. Die Entdeckung und weitere Entwicklung von fluoreszierenden Proteinen wie dem GFP vereinfacht die Lokalisation und *in vivo* Charakterisierung erheblich und eröffnet neue Möglichkeiten. Mittels hochauflösender digitaler Videomikroskopie können die GFP-Fusionsproteine-exprimierenden Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden. In dieser Arbeit wurden die rekombinanten Proteine eingesetzt, um die GFP-Fusionsproteine in zwei zellulären, hoch dynamischen, aktinfilamentbildenden Strukturen zu lokalisieren und zu charakterisieren. Zum einen sind es Lamellipodien der Zelle, zum anderen ist es das Listeriensystem, welches die aktinvermittelte Bewegung nutzt, um sich intrazellulär fortzubewegen.

Zytoskelettproteine besitzen gegenüber z.B. zytoplasmatischen Proteinen den Vorteil, daß sie innerhalb der Zelle eine bestimmte Lokalisation beispielsweise in „focal contacts“, Streßfasern oder Lamellipodien besitzen, die durch eine Kaskade von Bindungsproteinen erzeugt wird. Für diese Untersuchungen ist es zwingend notwendig, durch weitere Analysen, wie der indirekten Immunfluoreszenz, sicherzustellen, daß das exprimierte GFP-Fusionsprotein in seiner zellulären Verteilung dem endogenen Protein entspricht.

4.3.1 Lokalisation und Dynamik von EVH1- Domänen tragenden Proteinen in Lamellipodien und dem listeriellen Modellsystem

VASP wurde an „focal contacts“, Zell-Zell-Kontakten, entlang von Streßfasern, Filopodien und Lamellipodien, d.h. an Orten dynamischer Aktinreorganisation lokalisiert (Reinhard et al. 1992, Holt et al. 1998). Für Mena wurde, wie für VASP, die Bindung an prolinreiche Sequenzen von Zyxin, Vinculin und ActA über die EVH1-Domäne nachgewiesen (Chakraborty et al. 1995, Gertler et al. 1996, Niebuhr et al. 1997, Krause persönliche Mitteilung). Die Rekrutierung von VASP an die „focal contacts“ und Streßfasern findet durch Zyxin und Vinculin statt.

Die Lokalisation von Mena in den „focal contacts“ ist vorwiegend auf die Bindung an Zyxin und nicht an Vinculin zurückzuführen. Nach Delokalisation von Zyxin aus den „focal contacts“ durch Mikroinjektion eines Peptides, welches die Interaktion zwischen Zyxin und α -Actinin zerstört, wurde ebenfalls eine Beeinträchtigung der Lokalisation des Proteins Mena festgestellt, im Gegensatz zu der Lokalisation von Vinculin, welches nahezu unbeeinträchtigt blieb (Dress et al. 2000).

In dieser Arbeit wurden für die Lokalisation und Dynamikstudien GFP-Fusionsprotein exprimierende B16F1 Zellen eingesetzt, da diese in Abhängigkeit vom Substrat stark Lamellipodien ausprägen (Ballestrem et al. 1998). Dadurch kann die Lokalisation einerseits von den GFP-Fusionsproteinen der Ena/VASP-Familie und andererseits von Aktin und Aktin-assoziierten Proteinen detailliert untersucht werden. Allerdings kann durch stabile Expression von GFP-VASP in PtK2-Zellen gezeigt werden, daß die Zelle GFP-VASP nicht nur in die „focal contacts“, sondern auch in dem Lamellipodium (Abbildung 21A) vorhanden ist. Die GFP-VASP enthaltende Führungslamelle haftet nicht am Substrat, wie durch Videomikroskopie dieser Zellen gezeigt werden konnte. Die Lokalisation von GFP-VASP wurde kürzlich in einem Infektionsversuch mit *Listeria monocytogenes* beschrieben (Carl 1998, Carl et al. 1999). Die Verwendung der GFP-Fusionsproteine zeigte, daß VASP und Mena nicht nur in „focal contacts“, sondern auch an dem äußersten Rand der Lamellipodien und an den Spitzen der Filopodien lokalisieren. Es ist bekannt, daß VASP in Lamellipodien vorhanden ist (Reinhard et al. 1992). Jedoch wurde hier keine differenzierte Verteilung publiziert, wie beispielsweise in dieser Arbeit (siehe Abbildung 21, Abbildung 22 und Rottner et al. 1999) gezeigt werden konnte. In B16F1-Zellen kann nicht nur VASP, sondern auch Mena (Abbildung 21) und Profilin (Geese et al. 2000) in den „focal contacts“ und dem Lamellipodiensaum nachgewiesen werden. Die Lokalisation von GFP-VASP in stabil transfizierten B16F1 GFP-VASP-Zellen an dem äußeren Rand der Führungslamelle und an den Spitzen der Filopodien konnte eindeutig einerseits durch Videomikroskopie und andererseits durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden

(Abbildung 22). Durch die Auflösung der digitalen Videomikroskopie ist es gelungen, die Führungslamelle in kleine, hoch dynamische „focal contacts“ und den Saum der Führungslamelle zu unterteilen. Durch die Intensitätsmessung der Fluoreszenzverteilung können die unterschiedlichen Verteilungen von Aktin und VASP deutlich hervorgehoben werden (Abbildung 21, Rottner et al. 1999).

Bei einer Listerieninfektion von transfizierten Zellen mit GFP-Fusionsproteinen von VASP oder Mena wird beobachtet, daß intrazelluläre Listerien, die sich nicht bewegen oder sich in der Teilungsphase befinden, die Proteine der Ena/VASP-Familie akkumulieren (Carl 1998, Dädelow 1999). Erst in der späteren Teilungsphase kann die Entstehung eines Gradienten an einem Pol erkannt werden. Die Effektorfunktion der Ena/VASP-Familie durch die Fähigkeit der Multimerisierung und der daraus hervorgehenden größeren Bindungskapazität von weiteren Proteinen wie Profilin wurde von Gertler et al. (1996) und Niebuhr et al. (1997b) diskutiert. Die Abhängigkeit der Rekrutierung von Profilin, das erst bei dem Start der intrazellulären Bewegung an dem posterioren Pol der Listerien lokalisiert wird, zeigt, daß die Konzentration von GFP-Profilin um so höher war, je schneller sich die intrazellulären Listerien bewegten (Geese et al. 2000).

In vitro Experimente zeigten, daß die EVH2-Domäne nicht nur die Funktion der Multimerisierung besitzt, sondern auch eine Bindung zu F-Aktin herstellen kann (Carl et al. 1999, Laurent et al. 1999, Bachmann et al. 1999, Hüttelmaier et al. 1999). Der Pol, an dem die Polymerisation der Aktinfilamente stattfindet, ist vergleichbar mit den Lamellipodien, da dort durch die Verlängerung der Aktinfilamente die treibende Kraft entsteht, die für die Vorwärtsbewegung von Bakterien und Lamellipodien verantwortlich ist. Die Ena/VASP-Familie ist in der Lage, durch die Rekrutierung des Profilaktins, einem Komplex aus Profilin und Aktin, sowohl die Konzentration von polymerisierungsfähigem Aktin als auch die Polymerisationsfähigkeit von Aktin in diesen Funktionsbereichen stark zu erhöhen und damit die Aktinfilamentbildung effektiv zu fördern und zu stabilisieren.

4.3.2 Die Lokalisation der Ena/VASP-Familie in Lamellipodien

GFP-VASP und GFP-Mena werden an Orten hoher Aktinpolymerisation lokalisiert. An retrahierenden Lamellipodien konnte keine Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine erkannt werden, wie sie im Gegensatz zu sich nicht bewegendenden Bakterien erfolgt. Somit hat die Aufklärung der Bindungspartner der GFP-Ena/VASP-Proteine wesentliche Bedeutung für die

grundlegende Funktionsweise hinsichtlich der Zelldynamik. Durch die detaillierten Untersuchungen zwischen den polyprolinreichen Sequenzen von ActA und den Proteinen der Ena/VASP-Familie konnte die Bedeutung des FPPPP-Motivs für die EVH1-Domäne als Rekrutierungsmotiv festgestellt werden. Dieses Motiv ist ebenfalls in den „focal contact“ Proteinen Zyxin und Vinculin vorhanden, die als ActA analoge Proteine gelten. Kürzlich identifizierte Krause et al. (2000) das hematopoetische Protein Fyb/SLAP als ein neues ActA analoges Protein, welches die EVH1-Domäne der Ena/VASP-Proteinfamilie zu binden vermag. Gegenfärbungen mit Zyxin, Vinculin und Paxillin (Abbildung 23) in B16F1 GFP-VASP stabil exprimierenden Zellen zeigen, daß diese „focal contact“ Proteine nicht in der Führungslamelle vorhanden sind und daher hier keine Kollokalisierung mit GFP-VASP zeigen. Zyxin, ein 82 kDa Protein, wurde als ein Protein beschrieben, welches auch in Lamellipodien vorhanden ist (Beckerle et al. 1998). VASP und Mena werden über die EVH1-Domäne an Zyxin und Vinculin über das FPPPP-Motiv gebunden. Dies konnte in Injektionsversuchen durch die Delokalisierung der Ena/VASP-Familie mit Peptiden der prolinreichen Sequenz gezeigt werden (Niebuhr et al. 1997b). Jedoch zeigten kürzlich erhaltene Ergebnisse (persönliche Mitteilung M. Krause) durch den Einsatz von GFP-Zyxin und GFP-Paxillin, daß diese Proteine ebenfalls nicht in der Spitze der Führungslamelle vorhanden sind.

Carl et al. (1999) verwendeten unterschiedliche Fragmente von VASP, Mena und EVL-GFP-Fusionsproteine, um die Eigenschaft der Bindung zwischen den Mitgliedern der Ena/VASP-Proteinfamilie zu ActA zu untersuchen und darzustellen. Dabei wurde das Konstrukt EVH1-Mena benutzt, welches an die Listerien über das FPPPP-Motiv rekrutiert wird. Durch die Charakterisierung des Bindungsmotivs über das Zweihybridsystem in Hefe, den Einsatz der GFP-Fragmente und durch Strukturanalysen kann die EVH1 Domäne als ein stabiles Modul angesehen werden (Prehoda et al. 1999, Fedorov et al. 1999). In dieser Arbeit wurde das EVH1-Mena GFP-Konstrukt in B16F1-Zellen transfiziert und mit Hilfe der Videomikroskopie analysiert. Das Fusionsprotein ist in den „focal contacts“ der Zelle lokalisiert, jedoch nicht in der Führungslamelle der Lamellipodien und auch nicht in an den Spitzen der Filopodien (Abbildung 24). Durch die oben erwähnte Unstimmigkeit in der zellulären Lokalisierung der bisher bekannten Bindungspartner der Ena/VASP-Proteinfamilie stellt sich die Frage, welches Protein oder auch welche Proteine für die Rekrutierung von VASP und Mena an die Führungslamelle und an die Spitzen der Filopodien verantwortlich gemacht werden kann/können. Es bieten sich zwei Möglichkeiten an:

- Das Protein ist ein neuer Bindungspartner, welcher die Proteine der Ena/VASP-Familienmitglieder an den äußeren Bereich des Lamellipodien rekrutiert. Wahrscheinlich

wird das Protein nicht durch die EVH1-Domäne, sondern mit Beteiligung einer anderen Domäne vermittelt, die in der Ena/VASP-Proteinfamilie stark konserviert ist, wie das G(P)5-Motiv oder die EVH2-Domäne. Es wird also unabhängig von der EVH1-Domäne an die Führungslamelle rekrutiert.

- In hematopoetischen Zellen wurde ein neues Protein identifiziert, Fyb/SLAP, welches in den äußeren Strukturen von sich ausbreitenden Lamellipodien bei Thrombozyten lokalisiert werden konnte. Krause et al. zeigten, daß Fyb/SLAP ein neuer Bindungspartner der Ena/VASP-Proteinfamilie ist. Ein homologes Protein für Fyb/SLAP in nicht hematopoetischen Zellen ist bisher nicht identifiziert worden (Krause et al. 2000).

Außerdem konnte in dieser Arbeit das Protein prp48 identifiziert und der Nachweis erbracht werden, daß eine Bindung zwischen den prolinreichen Motiven von prp48 und der EVH1-Domäne von Mena möglich ist. Dem Maus prp48 Protein wird eine PH-Domäne zugeordnet. In dieser Arbeit konnte noch keine Lokalisierung des prp48-Proteins in der Führungslamelle gezeigt werden, jedoch könnte das Protein auch als Adapter zwischen Membran und z.B. Mena in Frage kommen.

4.3.3 Lokalisation und Dynamik des Arp2/3-Komplexes und Aktin

Der Arp2/3-Komplex enthält wichtige Funktionen, die für die Nukleation und das „crosslinking“ von Aktinfilamenten notwendig sind. Diese Prozesse werden „dendritic nucleation“ genannt (Mullins et al. 1998). Wenn der Komplex durch Mitglieder der WASP-Familie oder das listerielle Äquivalent ActA aktiviert wird, nukleiert ein neues Aktinfilament und schützt die „pointed ends“, woraus eine orthogonale Verzweigung mit einem charakteristischem Winkel von ca. 70° resultiert. Nach der Nukleation dissoziieren die Aktivatorproteine (WASP oder ActA) von dem Arp2/3-Komplex, der wiederum neu Aktin nukleiert (Borisy et al. 2000). Der Arp2/3-Komplex ist in Lamellipodien an den orthogonalen Verzweigungen lokalisiert (Svitkina et al. 1999b, Mullins et al. 1999). Mit der Funktion des Arp2/3-Komplexes ist eine starke Kolokalisation von Aktin verbunden, die nur in zellulären Strukturen hoher Dynamik, wie den Lamellipodien, den „actin patches“ und der Schweifbildung von intrazellulären Listerien und Shigellen vorhanden ist. Die Verteilung des Arp2/3-Komplexes innerhalb von Lamellipodien der GFP-Fusionsproteine p21-Arc (Abbildung 25) und Arp3 entsprechen der von Aktin. Der Gradient, der durch die Messung der Intensität des GFP-Fusionsproteins erhalten wird, entspricht der des Aktins, wie es auch von Svitkina et al. (1999b) beschrieben wurde. Die höchste gemessene Konzentration von Aktin und Arp2/3-Komplex ist an der Spitze der Führungslamelle

und sinkt dann gleichmäßig bis zum Ende des Führungssaumes ab (siehe auch Abbildung 25). Durch Auswertung der Videomikroskopiedaten von GFP-p21-Arc (Abbildung 26) und GFP-Arp3 konnte in den sich vorschiebenden Lamellipodien immer diese typische Verteilung des oben beschriebenen Gradienten nachgewiesen werden. Bei der Retraktion der Lamellipodien wird jedoch eine Delokalisation der GFP-Proteine beobachtet, wie es auch in Abbildung 26 durch Pfeile gekennzeichnet ist. Außerdem konnte mittels Videomikroskopie festgestellt werden, daß der Arp2/3-Komplex bei Anwesenheit von Filopodien, die sich lateral zur Ausdehnungsrichtung der Lamellipodien bewegen (Small et al. 1994), in diesen Strukturen nicht lokalisiert werden kann. Diese Beobachtung dokumentierten auch Svitkina et al. (1999b) durch elektronenmikroskopische Daten. Filopodien bestehen aus langen, nicht verzweigten Aktinfilamenten, wie z.B. in Abbildung 22 zu erkennen ist. Diese Abwesenheit des Arp2/3-Komplexes kann dadurch erklärt werden, daß keine Verzweigung von Aktinfilamenten in Filopodien existiert.

In mit *Listeria monocytogenes* infizierten Zellen wird der Arp2/3-Komplex von Listerien rekrutiert und mit Aktinfilamenten kolokalisiert. Eine direkte Bindung zwischen listeriellern Oberflächenprotein ActA und Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Durch die Inkubation infizierter Zellen mit Latrunkulin B konnte in dieser Arbeit und von Pistor et al. (2000) eine Interaktion zwischen dem Arp2/3-Komplex und dem listeriellen Oberflächenprotein ActA trotz Unterbindung von F-Aktin Rekrutierung nachgewiesen werden. Da die Listerien schon während der ersten Stunde der Infektion Aktin rekrutierten, konnte durch die Bildung von Mikrokolonien gezeigt werden, daß die intrazellulären Listerien und deren Tochterzellen kein Aktin akkumulierten (Abbildung 28a und b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Arp2/3-Komplex rekrutiert wird (Abbildung 28d und e). Durch die Rekrutierung von Mena in der indirekten Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, daß diese Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes nicht artifiziell ist, da die direkte Interaktion von ActA und Mena eine Bindung ist, die nicht durch die Einwirkung von Aktin stattfindet (Abbildung 28c).

4.4 Verwendung von GFP-Antikörpern

Der vorteilhafte Nutzen von GFP innerhalb der Zellbiologie zeigt sich an dem steigenden Einsatz und den immer umfangreicher werdenden Einsatzmöglichkeiten dieses Proteins. Für die Untersuchung der Aktinfilamentdynamik ist es zur Analyse der Lokalisation und Dynamik von

beteiligten Proteinen nahezu unentbehrlich geworden, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wurde. Die Vorteile liegen in der einfachen Handhabung, in der Möglichkeit eine große Anzahl von Zellen modifizieren zu können, oder es können auch Einzelzellen direkt mit dem GFP-fusionierten Protein lokalisiert werden. Dies steht im Gegensatz zu anderen Fusionsproteinen, die durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden müssen. Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine kann *in vivo* beobachtet und die Dynamik der Proteine in Echtzeit studiert werden.

Dabei muß gewährleistet werden, daß sich das Fusionsprotein entsprechend seinem endogenen Protein verhält. Dies kann am effektivsten durch biochemische Vergleiche kontrolliert werden, wobei diese nicht immer zur Verfügung stehen. Um eine Charakterisierung der GFP-Fusionsproteine zu beginnen, dienen wieder Antikörper als ein wertvolles Werkzeug für vergleichende immunchemische Analysen.

Bei Proteinen, die als Antigen eingesetzt werden, besteht die Möglichkeit, daß der oder die Antikörper sowohl das native Protein als auch das denaturierte Protein erkennt. Die Qualität des Antikörpers wird durch das "screening" Verfahren bestimmt, mit dem die Reaktivität und Spezifität eines Antikörpers untersucht wird.

In dieser Arbeit wurde für die Herstellung von Antikörpern gegen GFP dieses als natives und glutaraldehydfixiertes Protein immunisiert. Es wurden polyklonale und monoklonale Antikörper mit den folgenden Ergebnissen hergestellt:

- Die Antikörper sollten im Westen Blot spezifisch GFP erkennen, um die in den Zellen exprimierte Menge des GFP-Fusionsproteins zu dokumentieren.. Es ist für die Charakterisierung der GFP-Fusionsproteine wichtig nachzuweisen, daß diese innerhalb der Zelle nicht in einer degradierten Form vorliegen. Der 101G4-GFP Antikörper erkennt die ca. 70kDa Bande des GFP-VASP Proteins ohne offensichtliche Kreuzreaktion mit anderen Proteinen, wie in dieser Arbeit an Hand der stabil exprimierenden GFP-VASP B16F1 Zelllinie im Vergleich zu der nicht transfizierten B16F1-Zelllinie nachgewiesen werden konnte (Abbildung 20A). Dadurch konnte gezeigt werden, daß das VASP-Fusionsprotein stabil innerhalb der Zelle vorliegt. Es besteht die Möglichkeit, daß in Zellen das Fusionsprotein instabil ist, so daß hauptsächlich freies GFP in der Zelle nachgewiesen wird, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden können.
- Die Antikörper sollten glutaraldehydfixierte GFP-Fusionsproteine erkennen, um in der Elektronenmikroskopie eine generelle Einsatzmöglichkeit zu realisieren. In dieser Arbeit

- konnte die Lokalisation des GFP-VASP Fusionsproteins an der Spitze der Führungslamelle und an den Spitzen der Filopodien elektronenmikroskopisch bestätigt werden (Abbildung 22). Nachdem der Nachweis erbracht ist, daß die GFP-Fusionsproteine sich wie endogene Proteine verhalten, können diese in der Arbeit hergestellten GFP-Antikörper als universelles Werkzeug eingesetzt werden, um GFP-Fusionsproteine in der Elektronenmikroskopie zu detektieren. Der Vorteil der hier vorgestellten monoklonalen Antikörper liegt darin, daß häufig monoklonale Antikörper glutaraldehydfixierten Antigene nicht mehr erkennen, da durch die Fixierung das Epitop verändert wird. Die GFP Antikörper, der anti-270F3 und das polyklonale, aufgereinigte Serum, können dazu dienen, die Fusionsproteine anstatt des endogenen Proteins elektronenmikroskopisch nachzuweisen.
- Durch Immunpräzipitation können die GFP-Fusionsproteine aus Zellen isoliert werden. Dabei kann die Methode dahingehend eingesetzt werden, daß direkt bindende oder auch komplexierte Proteine kopräzipitiert werden können. Der monoklonale Antikörper 27F5 und der polyklonale Antikörper sind in der Lage, die Fusionsproteine GFP-VASP und GFP-Zyxin zu präzipitieren (20C und E). Das endogene Protein VASP kann in der Immunpräzipitation von GFP-VASP kopräzipitiert werden. Dies zeigt einerseits, daß Fusionsproteine in der Zelle wie endogene Proteine mit ihren Bindungspartnern interagieren. Andererseits bietet es die Möglichkeit, Bindungsproteine zu identifizieren und durch anschließende N-terminale Sequenzierung der Proteine oder durch Massenspektrometrie zu analysieren.

4.5 Alternativen des listeriellen Modellsystems

Neben *Listeria monocytogenes* können auch andere bakterielle und virale Modellsysteme herangezogen werden, die Wirtszellproteine für die intrazelluläre aktinvermittelte Bewegung rekrutieren. Beispielsweise ist das Gram-negative Bakterium *Shigella flexneri* zu nennen, bei dem das polar sekretierte Protein IcsA (bzw. VirG) für die Aktinfilamentbildung verantwortlich ist. ActA und IcsA besitzen keine homologen Sequenzen, so daß auf eine unterschiedliche Strategie der Aktinrekrutierung zu schließen ist. Darüber hinaus sind auch die obligat intrazellulären *Rickettsia conorii* zu erwähnen, die hinsichtlich der aktinvermittelten, intrazellulären Bewegung noch weitestgehend unerforscht sind, was die aktinvermittelte intrazelluläre Bewegung betrifft. Eine vergleichende Studie zwischen *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und *Rickettsia conorii* zeigte, daß diese Bakterien unterschiedliche Proteine für die Aktinfilamentbildung nutzen (Gouin et al. 1999). Durch den Vergleich der unterschiedlichen

Mechanismen können die zellulären Proteine bestimmt werden, die für die aktinvermittelte Bewegung essentiell sind.

Da die intrazellulären Pathogene in zellfreien Systemen wie *Xenopus* Oozyten-Extrakt, Thrombozyten- oder Hirnextrakten zur Untersuchung der Motilität eingesetzt werden können, besteht die Möglichkeit, Bestandteile des Extraktes zu verändern, um unter definierten Bedingungen die Aufgaben der Wirtszellproteine in der Aktinfilamentbildung besser charakterisieren zu können. VASP wurde aus Thrombozytenextrakt immundepletiert und seine Rolle im Hinblick auf die listerielle Bewegung analysiert, indem das Protein und bestimmte Proteinfragmente dem System wieder zugeführt wurden (Laurent et al. 1999). Kürzlich konnte mit aufgereinigten Wirtszell und rekombinanten Proteinen, eine Rekonstitution der aktinvermittelten Bewegung von *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexnerie* gezeigt werden (Loisel et al. 1999), wodurch detaillierte Einblicke in die Funktionsweise der an der Aktinfilamentbildung beteiligten Zytoskelettproteine erhalten werden. Diese Systeme der Rekonstitution bieten die Möglichkeit, rekombinante, fragmentierte oder mutierte Proteine auf ihre Bedeutung in den bakteriellen Modellsystemen und letztendlich hinsichtlich ihrer Funktion in der Motilität der Zelldynamik zu analysieren.

4.6 Ausblick

Das positiv geladene „cluster“ im N-Terminus von ActA ist verantwortlich für die Aktinnukleation und somit die Aktinfilamentbildung. Durch diese Dominanz ist es problematisch, weitere Domänen von ActA funktionell zu untersuchen, die ebenfalls in der Aktinfilamentbildung involviert sind. Durch die Identifikation der prp48-Proteine, welche durch den ActA Antikörper 191E7 als analoges ActA identifiziert werden konnten, kann eine funktionelle Einschätzung der postulierten, aktinbindenden Domäne erfolgen. Es sollte durch die Charakterisierung des prp48-Proteins möglich sein, aktinbindende Eigenschaften dieser Domäne zu erkennen.

Die Charakterisierung des Proteins prp48 konnte in dieser Arbeit nur ansatzweise erfolgen. Die Funktion der Proteinfamilie in der Zelle wurde auf Grund der strukturellen Eigenschaften als Adapterprotein vermutet, ist jedoch bisher nicht weiter durch *in vitro* und *in vivo* Versuche bestätigt worden.

Über *in vitro* Bindungsexperimente der prp48-Proteine mit der EVH1-Domäne von Mena und mit dem FE65-Protein sind Interaktionen gezeigt worden. Eine differenzierte Analyse der Bindungseigenschaften dieser beiden konkurrierenden Proteine sollte untersucht werden, da zwei unterschiedliche Bindungsdomänen, die EVH1- und die WW-Domäne, in direkter Konkurrenz zueinander hinsichtlich des Bindungsmotiv zum prp48 Protein stehen.

Weitere Analysen wie z.B. die Mutagenese des prolinreichen Bindungsmotivs des prp48, geben zusätzliche Informationen über die Bindungseigenschaften von polyprolinreichen Sequenzen.

Durch die Herstellung von spezifischen GFP monoklonalen Antikörpern ist es gelungen, essentielle Werkzeuge herzustellen, die sicherlich bei der Analyse von GFP-Fusionsproteinen einen wesentlichen Beitrag leisten werden. Diese spezifischen Antikörper finden nicht nur in elektronenmikroskopischen Untersuchungen ihren Einsatz, sondern können als universelles Werkzeug eingesetzt werden.

Da die Proteine der Ena/VASP-Proteinfamilie nicht mit den bekannten Bindungsproteinen Zyxin und Vinculin in der Führungslamelle kolokalisieren, stellt sich die Frage, durch welche/s Protein(e) VASP und Mena an die Führungslamelle und die Filopodien rekrutiert werden.

Die Frage kann mit Hilfe der immunpräzipitierenden GFP-Antikörper angegangen werden, da die Möglichkeit besteht, stabile Zelllinien zum einen mit GFP-Mena und zum anderen mit der

Domäne GFP-EVH1-Mena zu generieren. Die Immunpräzipitation der GFP-Proteine mit den direkten Bindungspartnern stellt sich durch unterschiedliche präzipitierte Proteine im Gel dar. Zum einen können neue Bindungspartner der EVH1-Domäne-Mena identifiziert werden, zum anderen können durch Subtraktion des Bandenmusters der EVH1-Domäne-Mena zu Mena Proteine ausgemacht werden, die nicht in der EVH1-Domäne binden wie z.B. der Bindungspartner, der die Ena/VASP-Proteinfamilie an der Führungslamelle oder den Filopodien rekrutiert.

5. Zusammenfassung

Da das Oberflächenprotein ActA von *Listeria monocytogenes* das Aktinfilamentsystem der Wirtszelle reorganisiert und den vorhandenen zellulären Mechanismus für seine intrazelluläre Bewegung ausnutzt. Kann dies als Modellsystem der Aktinfilamentbildung innerhalb der Zelle dienen. Zur genaueren Charakterisierung der Aktinfilamentdynamik wurden in dieser Arbeit das Modellsystem der intrazellulären Listerienbewegung und GFP-Fusionsproteine eingesetzt:

- 1) In Infektionsversuchen von *Listeria monocytogenes* konnte durch Mikroinjektion von monoklonalen und polyklonalen spezifischen ActA Antikörpern die Aminosäureregion 84-97 als eine weitere funktionelle Domäne von ActA bestätigt werden. Diese Region besitzt einen fördernden Einfluß auf die intrazelluläre, aktinvermittelte Bewegung von *Listeria monocytogenes*. Die monoklonalen ActA Antikörper 358C1 und 191E7, die die Epitope der Aminosäuren 84-92 abdecken, riefen eine sofortige Inhibierung der intrazellulären listeriellen Motilität hervor. Bei der Injektion des monoklonalen Antikörpers 349D4 (Epitop AS 92-97) konnte eine 20%ige Verlangsamung der intrazellulären Bewegung festgestellt werden. Sowohl durch diese wie auch durch die Mikroinjektion der polyklonalen Peptidantikörper (AS 79-109) konnte keine Inhibierung der Interaktion von bekannten zellulären Bindungsproteinen des N-Terminus von ActA nachgewiesen werden.
- 2) Die funktionell wirksamen ActA Antikörper 191E7/358C1 und 349D4 zeigten eine Kreuzreaktion mit zellulären Proteinen in Western Blot und in der indirekten Immunfluoreszenz mit der Lokalisation von „focal contacts“. Durch „screenen“ einer cDNA HeLa-Expressionsbank, wurde das prp48-Protein als ein mögliches ActA analoges Protein identifiziert.

Die Analogie zwischen ActA und dem Protein prp48 wurde dadurch bewiesen, daß der ActA Antikörper 191E7 immobilisierte Peptide der postulierten analogen Sequenz des prp48-Proteins erkannte. Durch RACE-PCR wurde die humane prp48 cDNA erhalten und in einen GFP-Vektor kloniert. Nach Transfektion in REF52-Zellen wurde das GFP-prp48 in „focal contacts“ lokalisiert. Mit den geforderten Kriterien, Erkennung des analogen Proteins durch den ActA Antikörper 191E7 und der Lokalisation in „fokal contacts“, konnte das Protein prp48 als potentiell ActA analoges Protein identifiziert werden.

Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, daß die EVH1 Domäne von Mena an die prolinreiche Sequenz des prp48-Protein bindet.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der Lokalisation und Dynamik von GFP-Fusionsproteinen in infizierten Zellen und innerhalb von Lamellipodien.

- 1) In dem listeriellen Modellsystem konnte durch detaillierte Analyse in der digitalen Videomikroskopie die unterschiedliche Verteilung von Aktin und dem Arp2/3-Komplex gegenüber der Ena/VASP-Proteinfamilie aufgezeigt werden. Die Proteine Aktin, p21-Arc und Arp3 des Arp2/3-Komplexes werden im Laufe der intrazellulären Bewegung von einer uniformen bis zur einer polaren Verteilung innerhalb des F-Aktinschweif umgelagert, während die Proteine der Ena/VASP-Proteinfamilie am posterioren Pol der Listerien verbleiben.
- 2) Es konnte durch Videomikroskopie und elektronenmikroskopische Studien erstmals gezeigt werden, daß Proteine der Ena/VASP-Familie, VASP und Mena, nicht nur in „focal contacts“ sondern auch an der Spitze der Lamellipodien und Filopodien lokalisiert sind. Durch Kolokalisation von Zyxin, Vinculin und Paxillin und der Expression der EVH1-Domäne von Mena konnte dargestellt werden, daß keine Kolokalisation in der Führungslamelle und in Filopodien vorhanden ist. Was bedeutet, daß VASP und Mena nicht durch Zyxin und Vinculin an diese zellulären Strukturen rekrutiert werden.
- 3) Der Arp2/3-Komplex konnte in Lamellipodien in einer äquivalenten Verteilung wie Aktin lokalisiert werden. Weiterhin konnte bestätigt werden, daß der Komplex nicht in Filopodien vorhanden ist.
- 4) Monoklonale und polyklonale Antikörper wurden gegen GFP hergestellt. Drei unterschiedliche monoklonale Antikörper wurden isoliert, die erfolgreich für immunchemische Nachweismethoden eingesetzt werden konnten.

Die Antikörper des Klons 101G4 erkennen im Western Blot mit Gesamtzellextrakt spezifisch das GFP-Fusionsprotein ohne Kreuzreaktion mit anderen Zellproteinen.

In der indirekten Immunfluoreszenz GFP-transfizierter Zellen in PFA- und Glutaraldehydfixierung zeigte der Klon 270F5 eine deutliche Kolokalisation. Dieser Antikörper eignet sich gut für elektronenmikroskopische Studien.

Der Antikörper 27F3 wurde durch Immunpräzipitation der GFP-Proteine charakterisiert. Er ist sehr gut geeignet, GFP-Fusionsproteine und daran assoziierte Proteine aus Gesamtzellextrakten zu isolieren.

6. Literaturverzeichnis

Alberts B. (1987) Molekularbiologie der Zelle, 1. Aufl. VCH Weinheim, ISBN 3 527 26350 0

Bachmann C., Fischer L., Walter U and Reinhard M., (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. J Biol Chem Vol.247,**33**: 23549-23557

Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Imhof BA. (1998) Actin dynamics in living mammalian cells. J Cell Sci. **111**: 1646-1658

Bear JE., Rawls JF. and Saxe III CL. (1998) SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. J Cell Biol., **142**(5): 1325-1335

Beckerle MC. (1986) Identification of a new protein localized at sites of cell-substrate adhesion. J Cell Biol., **103**(5): 1679-1687

Beckerle MC. (1998) Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. Cell **95**(6):741-748

Bernardini ML., Mounier J., d'Hauteville H., Coquis-Rondon M. and Sanconetti PJ. (1989) Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexnerie* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc Natl Acad Sci USA **86**(10):3867-3871

Braun L., Ghebrehiwet B. and Cossart P. (2000) gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. EMBO J., **19**(7):1458-1466

Brindle NP., Holt MR., Davies JE., Price CJ. and Critchley DR.(1996) The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. Biochem J., **318**(Pt3):753-757.

Brundage RA., Smith GA., Camilli A., Theriot JA. and Portnoy DA. (1993) Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. Proc Nat Acad Sci USA **90**(24):11890-11894

Bork P. and Sudol M. (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? Trends Biochem Sci. **19**(12):531-533

Borisy GG. and Svitkina TM. (2000) Actin machinery: pushing the envelope. Curr Opin Cell Biol. **12**(1):104-112

- Carlier MF., Ducruix A. and Pantaloni D. (1999) Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol.* **6**(9):R235-R240
- Camilli A., Tilney LG. and Portnoy DA. (1993) Dual role of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **8**(1):143-157
- Carl UD. (1998) Charakterisierung der EVH1-Domäne in Ena/VASP Proteinen und ihrer Bindung an ActA, einem Oberflächenprotein von *Listeria monocytogenes*. Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig
- Carl UD., Pollmann M., Orr E., Gertler FB., Chakraborty T and Wehland J. (1999) Aromatic and basic residues within the EVH1 domain of VASP specify its interaction with proline-rich ligands. *Curr Biol.* **9**(13):715-718
- Chakraborty T. and Goebel W. (1988) Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol.* **138**:41-48
- Chakraborty T., Ebel F., Domann E., Niebuhr K., Gerstel B., Pistor S., Temm-Grove CJ., Jockusch BM., Reinhard M., Walter U. and Wehland, J. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.*, **14**(7):1314-1321.
- Chen H., Bernstein BW. and Bamberg JR. (2000) Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *Trends Biochem Sci.* **25**(1):19-23
- Cicchetti G., Maurer P., Wagener P. and Kocks C. (1999) Actin and phosphoinositide binding by the ActA protein of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem.* **274**(47):33616-33626
- Cossart P. and Kocks C. (1994) The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **13**(3):395-402
- Cubitt AB., Heim R., Adams SR., Boyd AE, Gross LA. and Tsien RY. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent protein. *Trends Biochem Sci.* **20**(11):448-455
- Cudmore S., Cossart P., Griffiths G., Way M. (1995) Actin-based motility of *vaccinia* virus. *Nature* **378**(6557):636-638
- Darnell J., Lodish H and Baltimore D (1994) Molekulare Zellbiologie. De Gruyter ISBN 3-11-011934-X
- Dagert M. and Ehrlich S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**(1):23-28.

- Dädelow J. (1999) Elektronenmikroskopische Studien zur Immunlokalisation des listeriellen Oberflächenproteins ActA sowie seines zellulären Bindungspartners, des Vasodilator-stimulated Phosphoproteins (VASP) Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig
- Derry J.M., Ochs H.D., und Francke U., (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, **78**(4):635-644
- Domann E., Wehland J., Rohde M., Pistor S., Hartl M., Goebel W., Leimeister-Wächter M., Wuenscher M. and Chakraborty T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.*, **11**(5):1981-1990
- Dramsi S., Kocks C., Forestier C. and Cossart P. (1993) Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and pleiotropic activator prfA. *Mol.Microbiol.* **9**:931-941
- Drees BE., Andrews KM. and Beckerle MC. (1999) Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility. *J Cell Biol.* **147**(7):1549-1560
- Drees B., Friederich E., Fradelizi J., Louvard D., Beckerle MC. and Golsteyn RM. (2000) Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins. *J Biol Chem.* **275**(29):22503-22511
- Ebel F., Rohde M., von Eichel-Streiber C., Wehland J. and Chakraborty T. (1999) The actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* is not controlled by small GTP-binding proteins of the Rho- and Ras-subfamilies. *FEMS Microbiol Lett* **176**(1):117-127
- Egile C., Loisel TP., Laurent V., Li R., Pantaloni D., Sansonetti PJ. and Carlier MF. (1999) Activation of the CDC42 effector N-WASP by *Shigella flexnerie* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol.* **146**(6):1319-1332
- Ermekova KS., Zambrano N., Linn H., Minopoli G., Gertler F., Russo T. and Sudol M. (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila enabled. *J Biol Chem.* **272**(52):32869-32877
- Faber JM. and Peterkin PI. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol. Rev* **55**(3):476-511
- Frank, R. (1992) Spot synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, **48**:9217-9232
- Fedorov A.A., Fedorov E., Gertler F., und Almo S.C. (1999) Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat Struct Biol.*, **6**(7):661-665

- Frischknecht F., Cudmore S., Moreau V., Reckmann I., Rottger S. and Way M. (1998) Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not *Listeria* or *Shigella*. *Curr Biol*. **9**(2):89-92
- Gaillard JL., Berche P., Frehel C., Gouin E. and Cossart P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**(7):1127-1141
- Geese M., Schlüter K., Rothkegel M., Jockusch BM., Wehland J. and Sechi AS. (2000) Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci*. **113**(Pt8):1415-1426
- Geiger B. (1979) A 130 kDa protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell* **18**(1):193-205
- Gellin BG. and Broome CV. (1989) Listeriosis. *J.Am.Med*. **261**:1313-1320
- Geoffroy C., Gaillard JL., Alouf JE., Berche P (1987) Purification, characterization and toxicity of sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. **55**(7):1641-1646
- Gertler FB., Niebuhr K., Reinhard M., Wehland J. and Soriano P. (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* **87**(2):227-239.
- Golsteyn R.M., Beckerle M.C. Koay T. and Friedrich E. (1997) Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Sci*. **110**:1893-1906.
- Gouin E., Gantelet H., Egile C., Lasa I., Ohayon H., Villiers V., Gounon P., Sansonetti PJ. and Cossart P. (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci*. **112**(Pt11):1697-1708
- Gubin AN., Reddy B., Njoroge JM. and Miller JL. (1997) Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem and Biophys Res Commun*. **236**(2):347-350
- Halbrugge M., und Walter U. (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem*, **185**(1):41-50
- Halbrugge M., Friedrich C., Eigenthaler M., Schanzenbacher P. und Walter U. (1990) Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* **265**(6):3088-3093

- Heinzen RA., Hayes SF., Peacock MG., Hackstadt T. (1993) Directional actin polymerization associated with spotted fever group Rickettsia infection of Vero cells. *Infect Immun.* **61**(5):1925-1935
- Holt MR., Critchley DR. and Brindle NP. (1998) The focal adhesion phosphoprotein, VASP. *Int J Biochem Cell Biol.* **30**(3):307-311
- Hüttelmaier S., Harbeck B., Steffens O., Meßerschmidt T., Illenberger S. and Jockusch BM. (1999) Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* **451**(1):68-74
- Inouye S. and Tsuji FI. (1994) Aequores green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **341**(2-3):277-280
- Jockusch BM., Füchtbauer A., Wiegand C. and Höner B. (1986). Probing the cytoskeleton by microinjection. In cell and molecular biology of the cytoskeleton. J.W. Shay (Hrsg.), Plenum Publishing Corp. New York.: 1-40
- Kay BK., Williamson MP. and Sudol M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**(2):231-241
- Kelleher JF., Atkinson SJ. and Pollard TD. (1995) Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol.* **131**(2):385-397
- Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H. and Cossart P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**(3): 521-531
- Kocks C., Hellio R., Gounon P., Ohayon H. and Cossart P (1993) Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci.* **105**(Pt3):699-710
- Kovary K. (1995) Microinjection of antibodies. *Methods Enzymol.* **254**:445-458
- Krauss G (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Verlag Wiley-VCH, ISBN 3-527-29393-0
- Krause M. (1999) Zyxin und Fyb/SLAP: Charakterisierung bekannter und neuer Bindungspartner der EVH1-Domäne der Ena/VASP Proteinfamilie. Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig
- Krause M., Sechi AS., Konradt M., Monner D., Gertler FB. and Wehland J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated Protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton *J Cell Biol.* **149**(1):181-194

- Lamb NJ. and Fernandez A. (1997) Microinjection of antibodies into mammalian cells. *Methods Enzymol.* **283**:72-83
- Lasa I., David V., Gouin E., Marchand JB. and Cossart P. (1995) The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol Microbiol.* **18**(3):425-436
- Lasa I., Gouin E., Goethals M., Vancompernelle K., David V., Vandekerckhove J. and Cossart P. (1997) Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **16**(7):1531-1540
- Laurent V., Loisel TP., Harbeck B., Wehman A., Gröbe L., Jockusch BM., Wehland J., Gertler FB. and Carlier MF. (1999) Role of proteins of Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* **144**(6):1245-1258
- Leimeister-Wächter M. and Chakraborty T. (1989) Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*. *Infect. Immun.* **57**:2350-2357
- Leimeister-Wächter M., Haffner C., Domann E., Goebel W. and Chakraborty T. (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl Acad Sci USA* **87**(21):83336-8340
- Leimeister-Wächter M., Domann E. and Chakraborty T. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol.* **174**(3):947-952
- Lingnau A., Domann E., Hudel M., Bock M., Nichterlein T., Wehland J. and Chakraborty T. (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* **63**(10):3896-3903
- Loisel TP., Boujemaa R., Pantaloni D. and Carlier MF. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**(6753):613-616
- Machesky LM., Atkinson SM., Ampe C., Vandekerckhove J. and Pollard TD. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* **127**(1):107-115.
- Machesky LM. and Insall RH. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin skeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* **8**:1347-1356
- Machesky LM. and Gould KL. (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol.* **11**(1):117-121
- Machesky LM, Mullins RD., Higgs HN., Kaiser DA., Blanchoin L., May RC. Hall ME. and Pollard TD. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of the actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(7):3739-3744
- May R.C., Hall M.E., Higgs H.N., Pollard T.D., Chakraborty T., Wehland J., Machesky L.M. und Sechi A.S. (1999) The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol* **9**(14):759-762

- Mc Collum D., Feoktistova A., Morpew M., Balasubramanian M and Gould KL. (1996) The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *EMBO J.* **15**: 6438-6446
- Mengaud J. Ohayon H., Gounon P., Mege RM. and Cossart P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**(6): 923-932.
- Miki H., Miura K. and Takenawa T. (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**(19):5326-5335.
- Miki H., Sasaki T., Takai Y. and Takenawa T. (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**(6662):93-96.
- Mogilner A. and Oster G. (1996) Cell motility driven by actin polymerisation. *Biophys J.* **71**(6):3030-3045
- Moreau V., Madania A., Martin RP. and Winsor B. (1996) The *Sacchomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* **134**:117-132
- Mourrain P., Lasa I., Gautreau A., Gouin E, Pugsley A and Cossart P. (1997) ActA is a dimer. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(19):10034-10039
- Mullins RD., Stafford WF. and Pollard TD. (1997) Structure, subunit topology and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol.* **136**(2):331-343
- Mullins RD., Heuser JA. and Pollard TD. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(11):6180-6186
- Mullins R.D. and Pollard T.D. (1999) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Structural Biology* **9**:244-249
- Müller S. (2000) Untersuchungen des Internalin B-vermittelten Invasionsmechanismus von *Listeria monocytogenes* . Identifizierung eines Bindungspartners von InlB auf der eukaryontischen Zelloberfläche. Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig
- Niebuhr K., Chakraborty T., Rohde M., Gazlig T., Jansen B., Köllner P and Wehland J. (1993) Localization of ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin comets. *Infect. Immun.* **61**(7):2793-2802
- Niebuhr K. (1994) Untersuchungen zu Pathogenitätsmechanismen von *Listeria monocytogenes*: Charakterisierung des bakteriellen Virulenzfaktors ActA. Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig
- Niebuhr, K. and Wehland, J. (1997) Screening of antibody epitopes and regions of protein-protein interaction sites using SPOT peptides. In: *Immunology Methods Manual*, Academic Press:797-800.

- Niebuhr K., Ebel F., Frank R., Reinhard M., Domann E., Carl UD., Walter U., Gertler FB., Wehland J. and Chakraborty T. (1997b) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* **16**(17):5433-5444
- Niebuhr K., Lingnau A., Frank R. and Wehland J. (1998) Rapid procedures for preparing monoclonal antibodies and identifying their epitopes. In: *Cell Biology: A laboratory handbook*. Second Edition. Vol.2, Academic Press:398-403.
- Niswender KD., Blackmann SM., Rohde L., Magnuson MA. and Piston DW. (1995) Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc.* **180**(Pt2):109-116
- Pantaloni D. and Carlier MF. (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell* **75**(5):1007-1014.
- Peters J.H. und Baumgarten H (1990) *Monoklonale Antikörper - Herstellung und Charakterisierung*, 2.Auflage, Springer Verlag
- Pistor S., Chakraborty T., Niebuhr K., Domann E and Wehland J. (1994) The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J.* **13**(4):758-763
- Pistor S., Chakraborty T., Walter U. and Wehland J. (1995) The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol.* **5**(5):517-525
- Pistor S., Gröbe L. Domann E., Gerstel B., Machesky LM., Charkraborty T and Wehland J. (2000) Mutations of arginine residues within the $_{146}\text{-KKRRK}_{-150}$ motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex. *J Cell Sci.* **113**(pt18):3277-3287
- Prasher DC., Eckenrode VK., Ward WW., Prendergast FG and Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**(2):229-233
- Prehoda K.E., Lee D.J. und Lim W.A. (1999) Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell* **97**(4):471-480
- Purich DL. and Southwick FS. (1997) ABM-1 and ABM-2 homology sequences: consensus docking sites for actin-based motility defined by oligoproline region in *Listeria* ActA surface protein and human VASP. *Biochem Biophys Res Commun.* **231**:686-691
- Reinhard M., Halbrügge M., Scheer U., Wiegand C., Jockusch BM. and Walter U. (1992) The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* **11**(6):2063-2070.
- Reinhard M., Giehl K., Abel K., Haffner C., Jarchau T., HoppeV. Jockusch BM. and Walter U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* **14**(8):1583-1589

- Reinhard M., Rüdiger M., Jockusch BM. and Walter U. (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* **399**(1-2):103-107
- Rohatgi R., Ma L., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T. and Kirschner M. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**(2):221-231
- Rottner K., Behrendt B., Small JV. and Wehland J. (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol.* **1**(5):321-322
- Sanger JM., Sanger JW. and Southwick FS. (1992) Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **60**(9):3609-3619
- Schafer DA., Welch MD. Machesky LM., Bridgmann PC., Meyer SM. and Cooper JA. (1998) Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J Cell Biol* **143**(7):191-1930
- Schlegel H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag
- Sechi AS., Wehland J. and Small JV. (1997) The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J Cell Biol.* **137**(1), 155-167.
- Small JV. (1994) Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin Cell Biol* **5**(3):157:163
- Sohn RH and Goldschmidt Clermont PJ. (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* **16**(7):465-472
- Spector I., Shochet NR., Blasberger D. and Kashmann Y. (1989) Latrunculins: novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth. Comparison with Cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton* **13**(3):127-144
- Steffen P., Schafer DA., David V., Gouin E., Cooper JA. and Cossart P. (2000) *Listeria monocytogenes* ActA protein interacts with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate *in vitro*. *Cell Motil Cytoskeleton* **45**(1):58-66
- Sudol M. (1998) From Src homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* **17**:1469-1474
- Svitkina TM. and Borisy GG. (1999) Progress in protrusion: the tell-tale scar. *Trends Biochem Sci* **24**(11):432-436
- Svitkina TM. and Borisy GG. (1999b) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* **145**(5):1009-1026

- Theriot JA., Mitchison TJ., Tilney LG. and Portnoy DA. (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerisation. *Nature* **357**(6375):257-260
- Theriot JA., Rosenblatt J., Portnoy DA., Goldschmidt-Clermont PJ. and Mitchison TJ. (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *L.monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell*. **76**(3):505-517
- Tilney LG. and Portnoy DA. (1989) Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* **109**(4Pt1):1597-1608.
- Tilney LG., Connelly PS. and Portnoy DA.(1990) Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.***111**(6Pt2):2979-2988
- Tilney LG., DeRosier D. and Tilnay M.S. (1992a). How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement. *J Cell Biol.* **118**(1):71-81
- Tilney LG., D. DeRosier, Weber A. and Tilnay M.S. (1992b). How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. II. Nucleation, actin filament polarity, filament assembly and evidence for a pointed end cap. *J Cell Biol.* **118**(1):83-93.
- Vazquez-Boland JA., Kocks C., Dramsi.S., Ohayon H., Geoffroy C., Mengaud J. and Cossart P. (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun.* **60**(1):219-230
- Wang K., Feramisco JR. and Ash JF. (1982). Fluorescent localization of contractile proteins in tissue culture cells. *Methods Enzymol.* **85**:514-562.
- Wang S. and Hazelringg T. (1994) Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* **369**(6479):400-403
- Watson J.D., Gilman M., Witkowski J. und Zoller M. (1993) Rekombinierte DANN – 2.Auflage – Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., ISBN 3-86025-078-7
- Welch MD., Rosenblatt J., Skoble J., Portnoy DA. and Mitchison TJ. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**(5373):105-108.
- Wiesmann E. (1986) Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag
- Winter D., Lechler T. and Li R. (1999) Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP family protein. *Curr Biol.* **9**(9):501-504

Wojcik J., Girault JA., Labesse G., Chomilier J., Mornon JP. and Callebaut I (1999) Sequence analysis identifies a ras-associating (RA)-like domain in the N-termini of band 4.1/JEF domains and in the Grb7/10/14 adapter family. *Biochem Biophys Res Commun.* **259**(1):113-120

Yarar D., To W., Abo A. and Welch MD. (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating the actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* **9**(10):555-559

hu prp 48-1

```

GAATTCGCCCTTAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGTGCTGACAGCACTTCTCCCGGGGCAGCGACCTGGAGCCCTGGGTG 90
CTTAAGCGGGAAATTCGTACCAATTGTTGCGTCTCATGCGCCCCAGCTGTCTGTAAGGAGGGGGCCCGTCTGGACCTCGGGACCCAC
R I R P . A V V T T Q S T R G A D S T S S P G Q R P G A L G

CGGCAGTCTGCACCGCGCGTCTGCTTCCCGGCCGGAGTCTCGCCGCC TCCCGCGCCCCGAGCGCCCCGAGAGCAGTCGAGATGGGTG 180
GCCGTGAGACGTGGCGCGCAGCGAAAGGGCCGGCTTCAGAGCGGCGGAAGGGCGCGGGGCGTCTGCGGGGCGTCTGTCAGCTCTACCCAC
A A V C T A R R F P G R S L A A F P R P A A P R R A V E M G

AGTCAAGTGAAGACATAGACCAATGTTTACGACTTTGCTGGGAGAGATGGATCTTCTGACTCAGAGTTTAGGAGTTGACACTCTCCCTC 270
TCAGTTCACTTCTGTATCTGGTTTACAAGTCGTGAAACGACCTCTCTACCTAGAAGACTGAGTCTCAAATCCTCAACTGTGAGAGGGAG
E S S E D I D Q M F S T L L G E M D L L T Q S L G V Q T L P

CTCCTGACCCTAATCCACCCAGAGCTGAATTTAACTACAGTGTGGGGTTTAAAGATTTAAATGAGTCTTAAATGCACTGGAAGACCAAG 360
GAGGACTGGGATTAGGTGGGTCTCGACTTAAATGATGTCACACCCCAAAATTTCTAAATTTACTCAGGAATTTACGTGACCTTCTGGTTC
P P D P N P P R A E F N Y S V G F K D L N E S L N A L E D Q

ATTTAGATGCTCTCATGGCAGATCTGGTAGCAGACATAAGTGAGGCTGAGCAGAGGACAATCCAGGCACAGAAAGAGTCTTTCAGAAATC 450
TAAATCTACGAGAGTACCGTCTAGACCATCGTCTGTATTCACTCCGACTCGTCTCTGTAGGTCCGTGTCTTTCTCAGGAACGCTTAG
D L D A L M A D L V A D I S E A E Q R T I Q A Q K E S L Q N

AACATCATTCAGCATCTCTACAAGCATCAATTTTCACTGGTGCAGCCTCTCTTGGTTATGGAACAAATGTTGCTGCCACTGGTATCAGCC 540
TTGTAGTAAGTCGTAGAGATGTTCTGTAGTTAAAGTCACACGTCGGAGAGAACCAATACCTTGTTTACAACGACGGTGACCATAGTCGG
Q H H S A S L Q A S I F S G A A S L G Y G T N V A A T G I S

AATATGAGGATGACTTACCACCTCCACCAGCCGATCTGTGTTAGACCTTCCACTGCCACCACCACCTCTGAACCTCTCTCTCAGGAAG 630
TTACTCTCTACTGAATGGTGGAGGTGGTGGCTAGGACACAATCTGGAAGGTGACGGTGGTGGTGGAGGACTTGGAGAGAGAGTCTTTC
Q Y E D D L P P P P A D P V L D L P L P P P P P E P L S Q E

AGGAAGAAGCCCAAGCCAAGGCTGATAAAATTAACGTGGCGCTGGAAGAACTGAAGGAGGCCAAGGTTAAGAAGCTCGTCGTCAGGTC 720
TCCTTCTCGGGTTCGGTTCGACTATTTTAATTGCACCGCGACCTTTTGTACTTCTCCGGTTCCTCAATTTCTCGAGCAGCAGTTCCACG
E E E A Q A K A D K I N V A L E K L K E A K V K K L V V K V

ACATGAATGATAACAGCACAAAGTCACTGATGGTGGATGAGCGGCAGCTGGCCCGAGATGTTCTGGACAACCTTTTCGAGAAAACCTCATT 810
TGTACTTACTATTGTCGTGTTTCAGTGACTACCACCTACTCGCCGTCGACCGGGCTCTACAAGACCTGTTGGAAAAGCTCTTTTGAGTAA
H M N D N S T K S L M V D E R Q L A R D V L D N L F E K T H

GTGACTGCAATGTAGACTGGTGTCTTTATGAAATCTACCCGGAACCTACAATTTGAGAGGTTTTTTGAAGACCATGAAAAATGTTGTTGAAG 900
CACTGACGTTACATCTGACCACAGAAATACTTTAGATGGGCCTGTATGTTTAACTCTCCAAAAAATCTCTGGTACTTTTACAACAACCTTC
C D C N V D W C L Y E I Y P E L Q I E R F F E D H E N V V E

TCTTATCAGACTGGACAAGAGACACAGAAAAATAAAATCTATTTTTGGAGAAAGAGGAGAAATATGCTGTATTTAAAAACCCCAAGATT 990
AGAATAGTCTGACCTGTTCTCTGTGTCTTTATTTTATGATAAAAACTCTTTCTCTCTTTATACGACATAAATTTTGGGGGTCTTAA
V L S D W T R D T E N K I L F L E K E E K Y A V F K N P Q N

TCTACTTGGATAACAGAGGAAAAAAGAAAGCAAGGAACTAATGAGAAAAATGAATGCTAAGAAACAAGGAATCCTTACTTGAGGCTTACT 1080
AGATGAACCTATTGTCCTTTTTTTCTTTCTGTTCTTTGATTACTCTTTTACTTACGATTCTTGTCTTCTAGGAATGAACCTCCGAATGA
F Y L D N R G K K E S K E T N E K M N A K N K E S L L E A Y

TTTACAATATGCCGAGACTGTACTGACAACCTACCTTATGAAGTTGGGCTATTATTATTCATTTTAAACAAGTAAGTGGACTGAGGTTTA 1170
AAATGTTATACGGCTCTGACATGACTGTTGGATGGAATACTTCAACCCGATAATAAAGGTAAATTTGTCATTCACCTGACTCCAAAT
F Y N M P R L Y . Q P T L . S W A I I I P F . Q V S G L R F

ATGGCCCAAGGTCACAGAGTTAAGTGGTGAAGAGGCCTTGAGGTCTAACTCAGGAGCCAGGATTCCTTGATCGGTGTGTTATTCTTCTCT 1260
TACCGGGTGCCAGTGTCTCAATTCACCACCTTCCGGAACCTCCAGATTGAGTCTCGGTCTAAGAACTAGCCACACAATAAGAAGGAGA
N G P R S Q S . V V K R P . G L T Q E P G F L I G V L F F L

```

hu prp 48-2

```

AGTCCCTCTTGCCTCGAGGCTGCAAAATGGTTCCATTGCGCCAGGAGACGCTCCTGAGAGAAGGGCGCGCGGCACAGAGGCCCTTCCTTG 90
TCAGGGAGAACGCAGCTCCGACGTTTTACCAAGGTAAGCGGTCTCTGCGAGGACTCTCTTCCGCGCGCGCCGTGTCTCCGGAAGGAAC
V P L A S R L Q N G S I R Q E T L L R E G R A R H R G L P C

CACCTCGGAGCAAAGCAGCTCGGATAGCGCCACACGTCTGCGCGCTGCGTGGGAAGGGCAGGGCTGACAGCACTTCTCCCGGGGCAGC 180
GTGGAGCCTCGTTTCGTCGAGCCTATCGCGGTGTGACAGCGCGGACGACCCCTCCCGTCCGACTGTCGTGAAGGAGGGGCCCCGTG
T S E Q S S S D S A T R L R A A W E G Q G . Q H F L P G A A

GACCTGGAGCCCGGGTGCGGCAGTCTGCACCGCGCGTGCCTTCCCGGCCGGAGTCTCGCCGCTTCCCGCGCCCCGACGCGCCCCGAG 270
CTGGACCTCGGGCCACGCCGTACAGCTGGCGCGCAGCGAAAGGGCCGGCTCAGAGCGGCGGAAGGGCGCGGGGCTCGCGGGGCGTC
T W S P G A A V C T A R R F P G R S L A A F P R P A A P R R

AGCAGTCGAGATGGGTGAGTCAAGTGAAGACATAGACCAATGTTTACGACTTTGCTGGGAGAGATGGATCTTCTGACTCAGAGTTTAGG 360
TCGTACGCTCTACCCACTCAGTTTCACTTCTGTATCTGGTTTACAAGTCGTGAAACGACCTCTCTACCTAGAAGACTGAGTCTCAATCC
A V E M G E S S E D I D Q M F S T L L G E M D L L T Q S L G

AGTTGACACTCTCCCTCCTCTGACCCTAATCCACCCAGAGCTGAATTTAACTACAGTGTGGGGTTTAAAGATTTAAATGAGTCTTTAAA 450
TCAACTGTGAGAGGGAGGAGGACTGGGATTAGGTGGGTCTGACTTAAATTTGATGTACACCCCAAATTTCTAAATTTACTCAGGAATTT
V D T L P P P D P N P P R A E F N Y S V G F K D L N E S L N

TGCAGTGAAGACCAAGATTTAGATGCTCTCATGGCAGATCTGGTAGCAGACATAAGTGAGGCTGAGCAGAGGACAATCCAGGCACAGAA 540
ACGTGACCTTCTGGTTCTAAATCTACGAGAGTACCGTCTAGACCATCGTCTGTATTCACTCCGACTCGTCTCCTGTTAGGTCCGTGTCTT
A L E D Q D L D A L M A D L V A D I S E A E Q R T I Q A Q K

AGAGTCTTGCAGAATCAACATCATTGACATCTCTACAAGCATCAATTTTCACTGGTGCAGCCTCTCTTGGTTATGGAACAAATGTTGC 630
TCTCAGGAACGCTTGTAGTTAGTAAAGTCGTAGAGATGTTCTGTAGTTAAAGTCACACGTCGGAGAGAACCAATACCTTGTTTACAACG
E S L Q N Q H H S A S L Q A S I F S G A A S L G Y G T N V A

TGCCACTGGTATCAGCCAATATGAGGATGACTTACCACCTCCACAGCCGATCCTGTGTTAGACCTTCCACTGCCACCACCACCTCCTGA 720
ACGGTGACCATAGTCGGTTTACTCTTACTGAATGGTGGAGGTGGTCCGGCTAGGACACAATCTGGAAGGTGACGGTGGTGGTGGAGGACT
A T G I S Q Y E D D L P P P P A D P V L D L P L P P P P E

ACCTCTCTCTCAGGAAGAGGAAGAAGCCCAAGGCTGATAAAATTAAGCTGGCGCTGGAAAACTGAAGGAGGCCAAGGTTAAGAA 810
TGGAGAGAGAGTCTTCTCTCTTCTCGGGTTCGGTCCGACTATTTTAATTCGACCGGACCTTTTGACTTCTCCGGTTTCAATCTT
P L S Q E E E E A Q A K A D K I K L A L E K L K E A K V K K

GCTCGTCAAGGTGCACATGAATGATAACAGCACAAAGTCACTGATGGTGGATGAGCGGCAGCTGGCCCCGAGATGTTCTGGACAACCT 900
CGAGCAGCAGTTCACGTGTACTTACTATTGCTGTGTTTCAGTGACTACCACCTACTCGCGTCGACCGGGCTCTACAAGACCTGTTGGA
L V V K V H M N D N S T K S L M V D E R Q L A R D V L D N L

TTTCGAGAAAACCTATTGTGACTGCAATGTAGACTGGTGTCTTTATGAAATCTACCCGGAACACAAATTGAGAGGTTTTTTGAAGACCA 990
AAAGCTCTTTTGAAGTAACACTGACGTTACATCTGACCACAGAAATACCTTAGATGGGCTTGATGTTTAACTCTCCAAAAAATCTCTGGT
F E K T H C D C N V D W C L Y E I Y P E L Q I E R F F E D H

TGAAAATGTTGTTGAAGTCTTATCAGACTGGACAAGAGACACAGAAAAATAAAATACTATTTTGGAGAAAAGATTGAGAGGAGTCCCAG 1080
ACTTTTACAACAACCTTCAGAAATAGCTGACCTGTTCTCTGTGCTTTTATTTATGATAAAAACCTCTTCTTAAGTCTTCTCAGGGTC
E N V V E V L S D W T R D T E N K I L F L E K E F R R S P S

TATATCAAGTATCTCTGCTGTGATGACACAAGAACCCTTAACCAGTGGGTGATGGGAATACGGATAGCCAAGTATGGGAAGACTTTCTAT 1170
ATATAGTTCATAGAGACGACACTACTGTGTTCTTGGGAATTGGTCACCCAGTACCTTATGCTATCGGTTTACACCTTCTGAAAGATA
I S S I S A V M T Q E P L T S G S W E Y G . P S M G R L S M

GATAACTACCAGCGGGCTGTGGCAAAGGCTGGACTTGCTCTCGGTGGACAACTTGGGGACAGTCAATGCAGCTGCACCAAGCTCAGCCA 1260
CTATTGATGGTCGCCGACACCGTTTCCGACCTGAACGGAGAGCCACCTGTTTGAACCCCTGTCAGTTACGTGACGTCGGTCGAGTCGGT
I T T S G L W Q R L D L P L G G Q T W G Q S M Q L H Q L S H

```

8. Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie und Immunologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) durchgeführt.

Mein Dank gilt Prof. Jürgen Wehland für die Bereitstellung der Thematik dieser Arbeit, seine Betreuung, die jederzeit offene Tür und für die Diskussion von Ergebnissen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Prof. V.Small und Dr. K.Rottner (Institut für Molekular Biologie; Salzburg) für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Dieser Arbeitsgruppe danke ich für die jederzeit freundliche Aufnahme.

Für die Einarbeitung in das Forschungsgebiet der Listerien möchte ich mich bei Dr. Kirsten Niebuhr-Ebel bedanken, ebenso für die Bereitstellung auf der diese Arbeit basierende ActA Antikörper, bei Dr. U.Carl und Dr. L.Gröbe für die Bereitstellung von GFP-Konstrukten. Für die Anleitung der Durchführung der RACE-PCR möchte ich mich bei Dr. H. Engel bedanken, für die Einarbeitung in das digitale Videosystem bei Dr. A. Secchi.

Mein ganz besonderer Dank gilt Marlies Konradt für die Hilfe während der Endzeit der Arbeit, auch bei Petra Hagendorff und Amanda Mühlmann möchte ich mich vielmals bedanken, für die außergewöhnliche Unterstützung innerhalb des Labors, fürs Zellpuscheln und die weltlichen Diskussionen beim Kaffchen.

Selbstverständlich möchte ich meinen Dank meinen Laborveteranen und der gesamten Arbeitsgruppe aussprechen. Danke für die Unterstützung und die gute Atmosphäre, nur im Team läßt sich erfolgreich arbeiten.

Außerdem gilt mein Dank allen Korrektören, für den Blick auf das Inhaltliche und Orthographische dieser Arbeit.

Selbstverständlich darf ich meine „familie“ nicht unbedankt lassen, die mir die Möglichkeit geschaffen hat diese Arbeit zu verwirklichen –vielen Dank-. Insbesondere bin ich Dr. Matthias Fryda für seine Unterstützung und alles andere dankbar.